10-04

MultiReporter Assay System –Tripluc®– Vector Series

Code No.
MRV-101, MRV-102, MRV-103
MRV-201, MRV-202, MRV-203
MRV-301
MRV-501, MRV-502, MRV-503

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3556K

－目次－

[1] はじめに…… 2
[2] 製品内容 …… 3
[3] MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターの概要…… 4
1. ルシフェラーゼ遺伝子…… 4
2. short life タイプのルシフェラーゼ遺伝子…… 4
3. ベクターバックボーン …… 5
[4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法の概略 …… 6
1. 実験フロー …… 6
2. 被験配列（プロモーター）のクローニング …… 6
3. 発光の色分離測定…… 8
[5] ベクターマップ及び配列情報 …… 10
[6] ベクター制限酵素認識部位及び塩基配列…… 13
[7] トラブルシューティング…… 30
[8] 参考文献 …… 30
[9] 関連商品 …… 31

ご注意

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

本製品中のルシフェラーゼ遺伝子の使用にあたっては、独立行政法人産業技術総合研究所の許諾を受けています。ルシフェラーゼ遺伝子並びにこれらを用いたマルチ遺伝子転写活性測定技術について、独立行政法人産業技術総合研究所より特許出願中です。産業用利用については別途ライセンスが必要となりますので、弊社までお問い合わせください。

[1] はじめに

レポーター遺伝子を用いた遺伝子発現解析は、レポーター遺伝子に連結されたシス作用性塩基配列（プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど）を含むプラスミドを細胞に導入し、このレポーター酵素の活性を指標に遺伝子発現を評価する手法です。これまで多くのレポーター酵素が用いられてきましたが、感度が高く、活性測定が簡便なことから、ルシフェラーゼの発光を利用したシステムが広く用いられています。

産業技術総合研究所・近江谷先生らは、多くの発光酵素（ルシフェラーゼ）をクローニングし、その中から緑色発光ルシフェラーゼ（**G**reen、最大発光波長 550 nm）、橙色発光ルシフェラーゼ(**O**range、580 nm)、赤色発光ルシフェラーゼ（**R**ed、630 nm）について、哺乳類細胞における発現の実用化に成功しました(1-5)。これらのルシフェラーゼの発光スペクトルは比較的シャープで、かつ pH の影響を受けることなく安定していることから（**S**table **L**uciferase）、色分離測定に適しています。弊社では、近江谷先生らとの共同開発により、これらのルシフェラーゼを用いて、2 つあるいは 3 つの遺伝子発現を同時に測定することが可能なマルチ遺伝子転写活性測定システム MultiReporter Assay System –Tripluc®–及び専用のベクターシリーズを開発しました。

本製品には以下の特長があります。

特長 1 3 つの発光スペクトル

		最大発光波長(nm)	由来	アミノ酸配列
緑色発光ルシフェラーゼ	SLG	550	イリオモテボタル	野生型
橙色発光ルシフェラーゼ	SLO	580	イリオモテボタル	変異体 (T226N)
赤色発光ルシフェラーゼ	SLR	630	鉄道虫	野生型

3つの酵素活性は、色分離機能を備えたルミノメーターを用いて分離測定（同時測定）することが可能です。色分離機能を備えたルミノメーターとしては弊社カラフルックアナライザー™ (Code No. CLX-101) などがご利用いただけます。

特に、赤色発光ルシフェラーゼの発光は、実用化ルシフェラーゼの中でも最も長波長側にあります。

特長 2 共通の基質によるアッセイ

いずれのルシフェラーゼも、ホタルルシフェラーゼと同じ D-luciferin を基質としており、1 つの基質で 3 つのルシフェラーゼ活性を同時に測定することが可能です。従って、従来、複数反応あるいは複数工程で行っていたアッセイを、1 ステップで効率よく行うことが可能です。

さらに 3 つのルシフェラーゼを用いることができますので、1 つのルシフェラーゼをコントロール（内部標準）として、2 つの調べたいプロモーターを同時に解析することも可能です。

特長 3 Short life タイプベクター(MRV-501,502,503,511)

細胞内タンパク質半減期を短縮させ、バックグラウンドとなるシグナルが低減されています。サーカディアンリズム解析や刺激応答など、動的な遺伝子発現の解析に最適です。

[2] 製品内容

MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターシリーズ

品名	Size	Code No.
SLG プロモーター挿入用ベクター **pSLG-test**	20μg	MRV-101
SLO プロモーター挿入用ベクター **pSLO-test**	20μg	MRV-102
SLR プロモーター挿入用ベクター **pSLR-test**	20μg	MRV-103
SLG SV40 コントロールベクター **pSLG-SV40 control**	20μg	MRV-201
SLO SV40 コントロールベクター **pSLO-SV40 control**	20μg	MRV-202
SLR SV40 コントロールベクター **pSLR- SV40 control**	20μg	MRV-203
SLG HSVtk コントロールベクター **pSLG-HSVtk control**	20μg	MRV-301
SLG Short life タイププロモーター挿入用ベクター **pSLG(PEST)-test**	20μg	MRV-501
SLO Short life タイププロモーター挿入用ベクター **pSLO(PEST)-test**	20μg	MRV-502
SLR Short life タイププロモーター挿入用ベクター **pSLR(PEST)-test**	20μg	MRV-503

MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクター専用プライマー

品名	内容	Code No.
挿入配列確認用プライマー（フォワード、pSLG/pSLO/pSLR 共通） **SLGOR-F primer**	200 pmoles	MRV-401
挿入配列確認用プライマー（リバース、pSLG/pSLO 共通） **SLGO-R primer**	200 pmoles	MRV-402
挿入配列確認用プライマー（リバース、pSLR 用） **SLR-R primer**	200 pmoles	MRV-403

[3] MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターの概要

1. ルシフェラーゼ遺伝子

MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターシリーズは、緑色発光ルシフェラーゼ(SLG、最大発光波長 550 nm)、橙色発光ルシフェラーゼ(SLO、580 nm)、及び赤色発光ルシフェラーゼ(SLR、630 nm)の 3 色のルシフェラーゼで構成されます。各ルシフェラーゼの発光スペクトルを図 1 に示します。

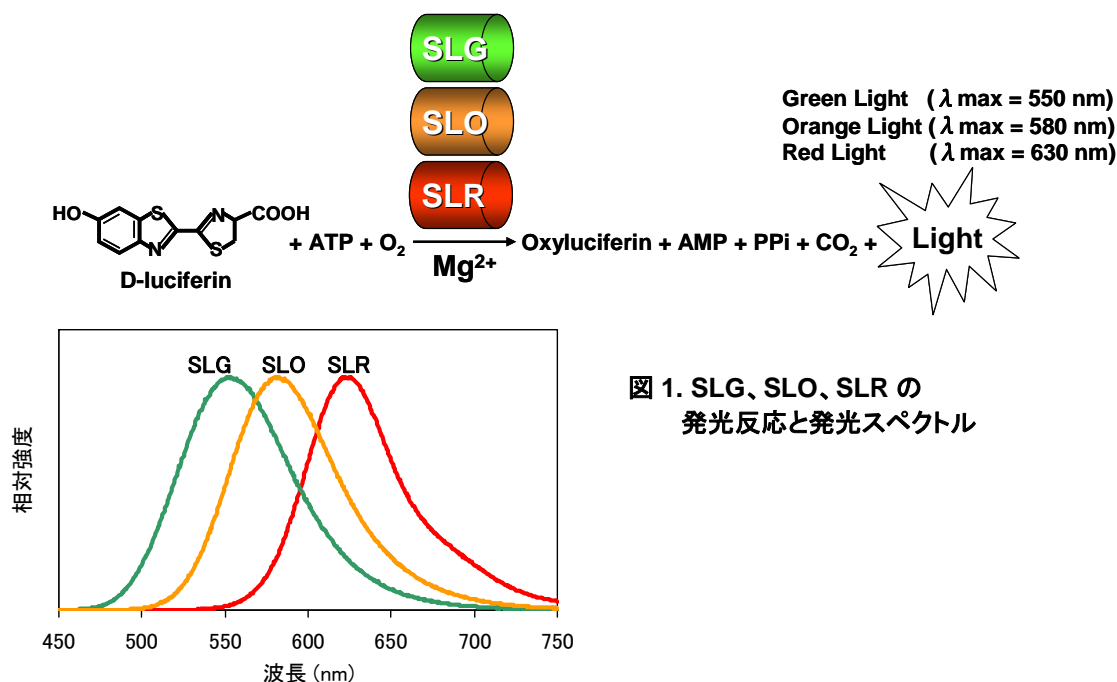



図 1. SLG、SLO、SLR の発光反応と発光スペクトル

2. Short life タイプのルシフェラーゼ遺伝子

一般に、一度発現したルシフェラーゼなどのレポータータンパク質が細胞内に比較的長時間とどまることによってバックグラウンドとなるシグナルが生じ、遺伝子発現の変化を過小評価してしまうケースがあります。Li らは、マウス ornithine dehydrogenase 由来 PEST 配列をレポーターに付加することによって不安定化させることに成功しました(6)。Short life タイプベクターはこの技術を応用した高レスポンス型ルシフェラーゼベクターです。

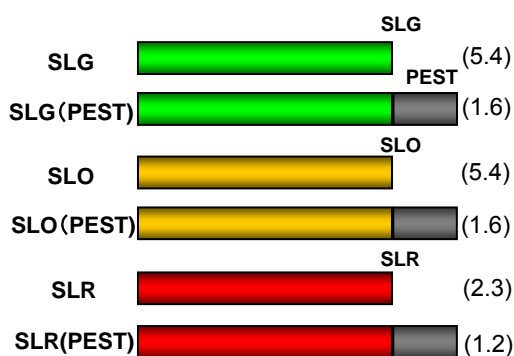



図 2. スタンドードルシフェラーゼと Short life タイプルシフェラーゼ
( )内はシクロヘキシミド処理によって見積もられた細胞内半減期(単位:hr)を示す。

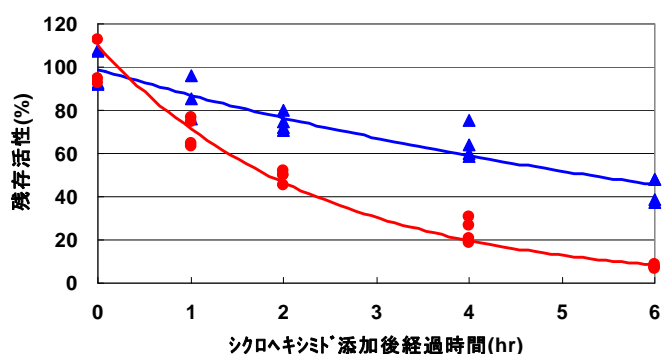



図3. SLO及びSLO(PEST) の細胞内安定性
SLO、SLO(PEST)を発現するCHO細胞をシクロヘキシミド処理した。残存発光活性をMultiReporter Assay System –Tripluc®- Detection Reagentsを用いて測定し、相対活性をプロットした。▲:SLO、●SLO(PEST).

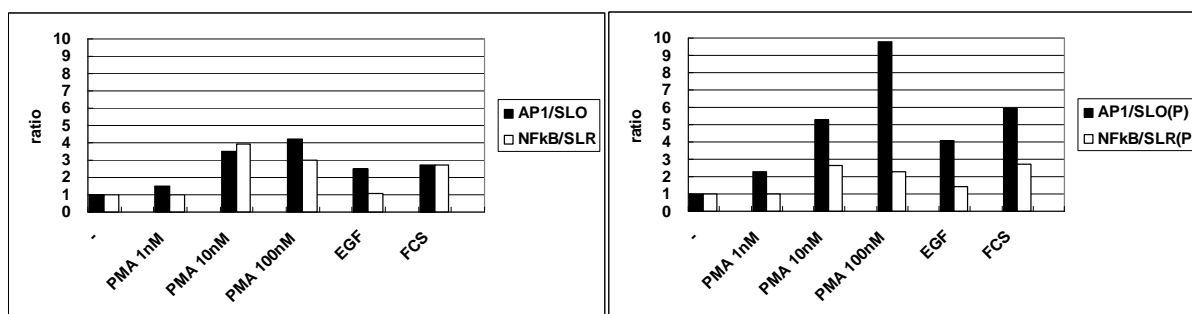



図 4. Short life タイプルシフェラーゼの初期応答性の向上
AP1 及び NFκB レスポンスエレメントを各レポータールシフェラーゼに連結し、インターナルコントロール pSLG-HSVtk control とともに、HeLa S3 細胞にコトランスフェクションした。無血清培地に各薬剤を添加し、3 時間インキュベートした。その後、ルシフェラーゼ活性を測定し、未処理条件を 1 としてプロットした。

3. ベクターバックボーン

MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターシリーズとして、マルチクローニングサイトを含むプロモーター挿入用ベクターである test ベクター、及び control ベクターを取り揃えています。SV40 プロモーターまたは HSVtk プロモーターを挿入した control ベクターを用途によって使い分けることができます。

MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターは以下のエレメントを有しております。

<u>SV40 Early Promoter 及び Enhancer</u>（pSLG/SLO/SLR-SV40 control）

Simian virus 40 に由来する転写制御配列であり、様々な細胞種で強力で比較的安定した発現を示します。発現活性が高いため、トランスフェクション効率の低い細胞株を用いる場合など、シグナルのレベルに問題がある場合に特に有効なコントロール用プロモーター配列です。これらのエレメントを含む control ベクターは SV40 プロモーター内に SV40 の複製起点を有するため、COS-1 及び COS-7 細胞のような SV40 large T antigen を発現する細胞では、一過性の複製が認められます。

<u>HSVtk Promoter</u>（pSLG-HSVtk control）

Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) 由来の転写制御配列プロモーターであり、低レベルの安定発現プロモーターです。発現活性が低い一方、SV40 プロモーターに比べ薬剤などの実験処理により変動する可能性が低く、より安定した内部標準として有用なコントロール用プロモーター配列です。

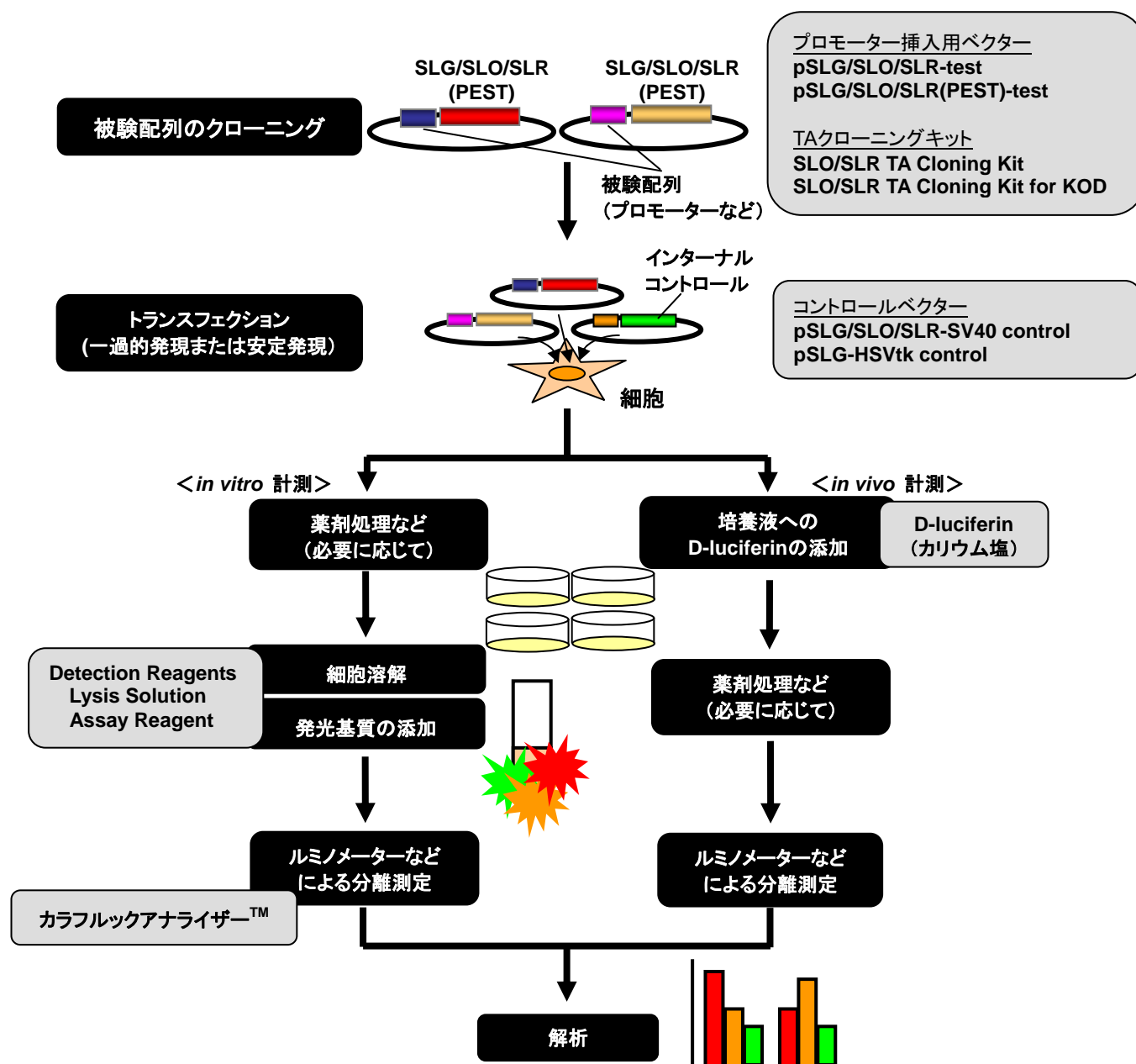
<u>SV40 late poly(A) signal</u>

ポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200～250 bp 程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。

<u>Background reduction signal</u>

ポリアデニル化シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early poly(A) signal をタンデムにルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減します(7)。<u>マルチクローニングサイトの上流にタンデムに配置されているため、インサート確認用のプライマーを設計される場合には注意が必要です。「挿入配列確認用プライマー（フォワード、pSLG/pSLO/pSLR 共通）SLGOR-F primer」（Code No. MRV-401）のご使用をお薦めします（p.7 をご参照下さい）。</u>

[4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法の概略

1. 実験フロー

*1 ; より精度の高い測定をしていただくために、SLG、SLO、SLR の発光量ができるだけ同レベルになるようにプラスミドの混合量を調整いただくことをお薦めいたします。この際、SLO、SLR に比べ SLG の発光の相対レベルが高いため、内部標準としてご利用いただくことをお薦めいたします(内部標準としての SLG をご利用いただくことで、多くの場合、内部標準として添加いただくプラスミド量を抑えることができます)。

*2 ; 2 色のアッセイでは SLG と SLR の組み合わせをお薦めいたします。

2. 被験配列(プロモーターなど)のクローニング

pSLG-test、pSLO-test、pSLR-test、pSLG(PEST)-test、pSLO(PEST)-test、pSLR(PEST)-test のマルチクローニングサイトへプロモーターなどのシスエレメントをクローニングします。

被験配列(プロモーターなど)のクローニングには、弊社 high fidelity ホットスタート PCR 酵素 KOD -Plus-(Code No. KOD-201)や KOD -Plus- Ver.2(Code No. KOD-211)のご使用をお薦めいたします。

インサートをご確認いただくためのコロニーダイレクト PCR あるいはシーケンス反応には、下記の挿入配列確認用プライマーのご使用をお薦めいたします。

フォワードプライマー

① (pSLG/pSLO/pSLR 共通)「SLGOR-F primer」(Code No. MRV-401)

```
          SLGOR-F
          CAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TC →
5' aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac
   ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg
   ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac
   tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat
   gtctgctcga ggtcgacggt atcgataagc ttacgcgtgc tagcgcatgc agatctacta gtcggccgga tatcgaattc
        Xho I  Sal I      Cla I  Hind III*1 Mlu I  Nhe I  Sph I  Bgl II  Spe I   EcoR V  EcoR I
   ctgcagccca ccaccatgg              マルチクローニングサイト
   Pst I*2       └→
           SLG/SLO/SLR
```

*1 *Hind* III認識配列はpSLG/SLO/SLR(PEST)-testベクターのプロモーター挿入に用いることはお薦めできません。

*2 *Pst* I認識配列はSLR遺伝子内にも存在しますので、pSLR-test、pSLR(PEST)-testベクターへのインサートの挿入に用いることはお薦めできません。

(注) バックグラウンド低減シグナルとして SV40 poly(A) signal が複数配置されているため、プライマーをマルチクローニングサイトの上流近傍に設計されますと、PCR 反応やシーケンス反応を上手く行うことができません。

リバースプライマー

① (pSLG/pSLO 共通)「**SLGO-R primer**」(Code No. MRV-402)

```
           10         20         30         40         50         60         70         80
5' ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
   Xho I  Sal I     Cla I  Hind III*1 Mlu I  Nhe I  Sph I  Bgl II  Spe I     EcoR V EcoR I Pst I
           90        100        110        120        130        140        150        160
   gcccaccacc atggctaacg agatcatcct gcacggcgcc aagcccaggg accccctgga cctgggcacc gccggcattc
   SLG/SLO └→          ← GTAGGA CGTGCCGCGG TTCGGGTC
          170        180                 SLGO-R primer
   agctctacag ggccctgacc
```

* 数字はpSLG-test、pSLO-test, pSLG(PEST)-test, pSLO(PEST)-testの配列番号を示します。

*1 *Hind* III認識配列はpSLG(PEST)/SLO(PEST)-testベクターのプロモーター挿入に用いることはお薦めできません。

② (pSLR 用)「**SLR-R primer**」(Code No. MRV-403)

```
           10         20         30         40         50         60         70         80
5' ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
   Xho I  Sal I     Cla I  Hind III*1 Mlu I  Nhe I  Sph I  Bgl II  Spe I     EcoR V  EcoR I  Pst I*2
           90        100        110        120        130        140        150        160
   gcccaccacc atggaagaag agaacatcgt gaatggcgat cgccctcggg atctggtgtt ccctggcaca gccggcctgc
      SLR └→               ← GCA CTTACCGCTA GCGGGAGCCC
          170        180                 SLR-R primer
   agctgtatca gtccctgtat
```

* 数字はpSLR-testの配列番号を示します。

*1 *Hind* III認識配列はpSLR(PEST)-testベクターのプロモーター挿入に用いることはお薦めできません。

*2 *Pst* I認識配列はSLR遺伝子内にも存在しますので、pSLR-testベクターへのインサートの挿入に用いることはお薦めできません。

3. 発光の色分離測定

MultiReporter Assay System –Tripluc®–の色分離測定には、弊社「カラフルックアナライザーTM」(Code No. CLX-101)、アトー株式会社「ルミネッセンサーMCA」(Code No. AB-2250)、あるいは微弱発光対応型マルチラベルプレートリーダー(パーキンエルマー社「ARVO シリーズ」など)など、色分離機能を備えたルミノメーターを用いることにより分離測定が可能です。

さらに、リアルタイム計測にはアトー株式会社「クロノス」(Code No. AB-2500)による色分離測定が可能です。

(1) チューブタイプルミノメーターを用いた 3 色ルシフェラーゼの分離測定

弊社「カラフルックアナライザーTM」やアトー株式会社「ルミネッセンサーMCA」を用いた測定方法をご紹介します。これらのルミノメーターには、色分離のため、560 nm ロングパスフィルター(560 nm LP、Filter 1)と 600 nm ロングパスフィルター(600 nm LP、Filter 2)が内蔵されています。

まず、SLG、SLO、SLR をそれぞれ別々に発現させた細胞を用いて、①フィルターを用いない測定(全光)、②560 nm LP (Filter 1)透過光の測定、③600 nm LP (Filter 2)透過光の測定を実施し、下記の係数を算出します。

係数名		表記	測定法
SLG	Filter 1 透過率	T1g	SLG 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2g	SLG 全光に対する Filter 2 透過光の割合
SLO	Filter 1 透過率	T1o	SLO 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2o	SLO 全光に対する Filter 2 透過光の割合
SLR	Filter 1 透過率	T1r	SLR 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2r	SLR 全光に対する Filter 2 透過光の割合

3 色のルシフェラーゼを含むサンプル中の SLG、SLO、SLR の発光量を G、O、R とした場合、①フィルターを用いない測定(全光)光量;F0、②560 nm LP (Filter 1)透過光の測定光量;F1、③600 nm LP (Filter 2)透過光の測定光量;F2 は下記のように記述されます。

$$F0 = G + O + R$$

$$F1 = T1g * G + T1o * O + T1r * R$$

$$F2 = T2g * G + T2o * O + T2r * R$$

つまり、各係数を決定し、F0、F1、F2 を測定することによって、G、O、R は下記のように算出されます。

$$G = \frac{(T1o * T2r - T1r * T2o) * F0 + (T2o - T2r) * F1 + (T1r - T1o) * F2}{T1g * T2o + T1r * T2g + T1o * T2r - T1g * T2r - T1r * T2o - T1o * T2g}$$

$$O = \frac{(T1r * T2g - T1g * T2r) * F0 + (T2r - T2g) * F1 + (T1g - T1r) * F2}{T1g * T2o + T1r * T2g + T1o * T2r - T1g * T2r - T1r * T2o - T1o * T2g}$$

$$R = \frac{(T1g * T2o - T1o * T2g) * F0 + (T2g - T2o) * F1 + (T1o - T1g) * F2}{T1g * T2o + T1r * T2g + T1o * T2r - T1g * T2r - T1r * T2o - T1o * T2g}$$

カラフルックアナライザーTM では、係数を予め入力しておくことで、G、O、R を自動で算出することが可能です。

＊ 上記測定原理は、アトー株式会社より特許出願中です(特開 2004-333457)。

＊＊ ２色の場合の分離測定には、560 nm LP (Filter 1)または 600 nm LP (Filter 2)のいずれかのフィルター、及び全光の測定で色分離測定が行えます。SLG 及び SLR、SLO 及び SLR をご使用の場合は 600 nm LP (Filter 2)を、SLG 及び SLO をご使用の場合は 560 nm LP (Filter 1)を選択いただくことをお薦めいたします。

(2) プレートリーダーを用いた3色ルシフェラーゼの分離測定(*)

パーキンエルマー社「ARVO シリーズ」を用いた測定方法をご紹介します。測定用フィルターとして、①波長510nm：半値幅 60nm (Filter1)、②595nm：60nm (Filter2)、③660nm:100nm (Filter3)を使用します。

まず、SLG、SLO、SLR をそれぞれ別々に発現させた細胞を用いて、①フィルターを用いない測定(全光)、②Filter 1 透過光の測定、③Filter 2 透過光の測定、④Filter 3 透過光の測定を実施し、下記の係数を算出します。

係数名		表記	測定法
SLG	Filter 1 透過率	T1g	SLG 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2g	SLG 全光に対する Filter 2 透過光の割合
	Filter 3 透過率	T3g	SLG 全光に対する Filter 3 透過光の割合
SLO	Filter 1 透過率	T1o	SLO 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2o	SLO 全光に対する Filter 2 透過光の割合
	Filter 3 透過率	T3o	SLO 全光に対する Filter 3 透過光の割合
SLR	Filter 1 透過率	T1r	SLR 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2r	SLR 全光に対する Filter 2 透過光の割合
	Filter 3 透過率	T3r	SLR 全光に対する Filter 3 透過光の割合

3色のルシフェラーゼを含むサンプル中の SLG、SLO、SLR の発光量を G、O、R とした場合、①Filter 1 の測定光量；F1、②Filter 2 の測定光量；F2、③Filter 3 の測定光量；F3 は下記のように記述されます。

$$\begin{pmatrix} F1 \\ F2 \\ F3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T1g & T1o & T1r \\ T2g & T2o & T2r \\ T3g & T3o & T3r \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

つまり、各係数を決定し、F0、F1、F2 を測定することによって、G、O、R は下記のように算出されます。

$$\begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T1g & T1o & T1r \\ T2g & T2o & T2r \\ T3g & T3o & T3r \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F1 \\ F2 \\ F3 \end{pmatrix}$$

この計算は、Microsoft® Excel を用いて行うことができます。下記の Microsoft® Excel の関数をご利用ください。

逆行列の算出

算出結果(逆行列)を表示するセル(「3 行×3 列」の範囲)を指定後、「MININVERSE」関数を選択し、元になる配列(「3 行×3 列」の範囲)を指定し、「Ctrl キー+ Shift キー」を押しながら「OK」をクリックします。

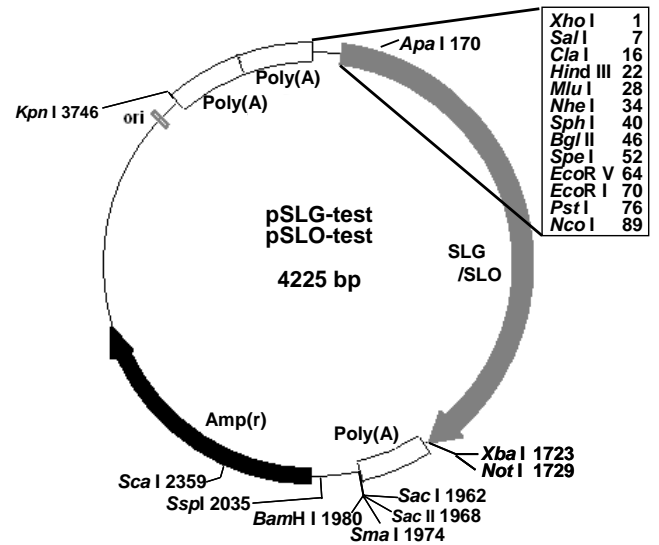
行列計算

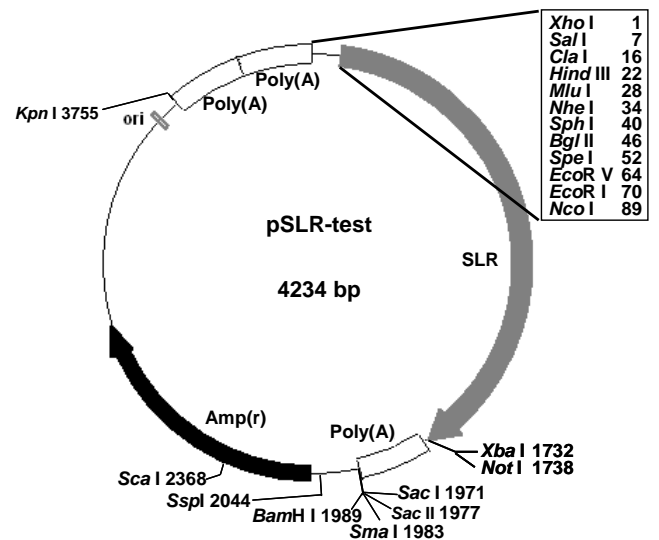
算出結果を表示するセル(「3 行×1 列」の範囲)を指定後、「MMULT」関数を選択し、透過率の逆行列(「3 行×3 列」の範囲)及び測定値の行列(「3 行×1 列」の範囲)の配列 2 つを指定後、「Ctrl キー + Shift キー」を押しながら「OK」をクリックします。

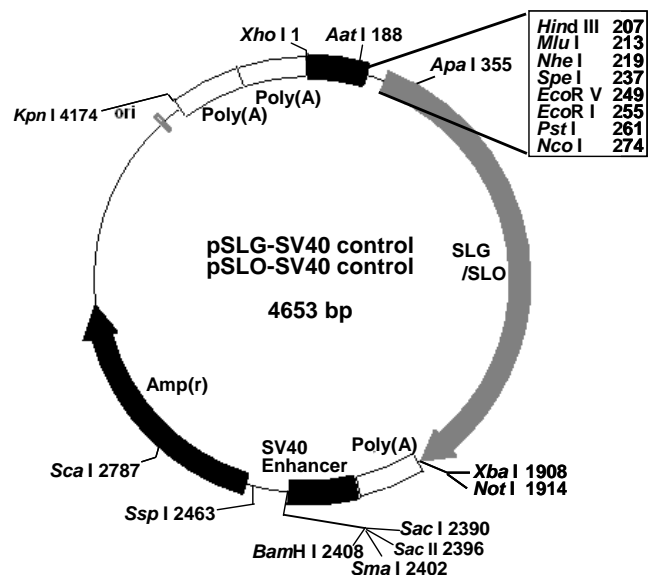
＊特許出願中

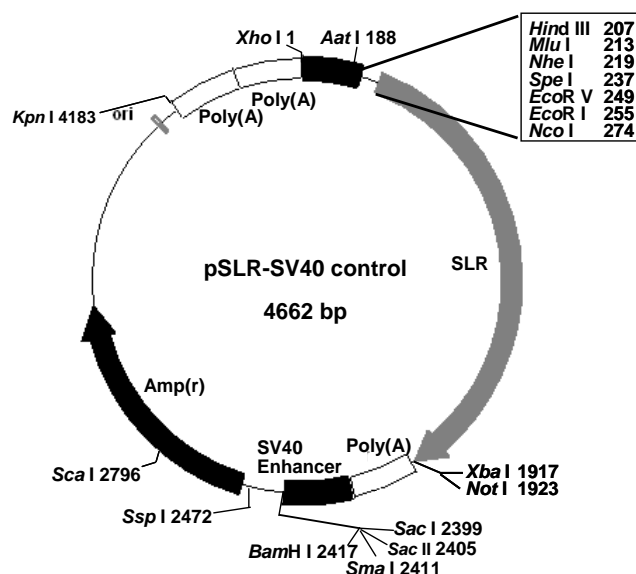
[5] ベクターマップ及び配列情報

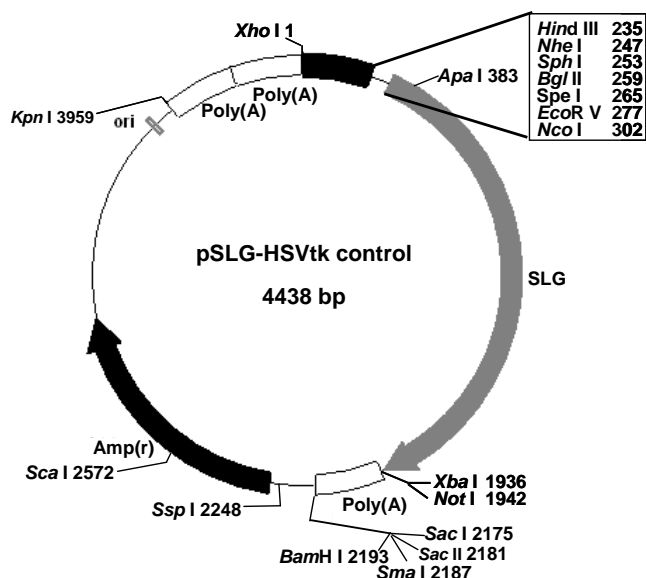
(1) pSLG-test、pSLO-test

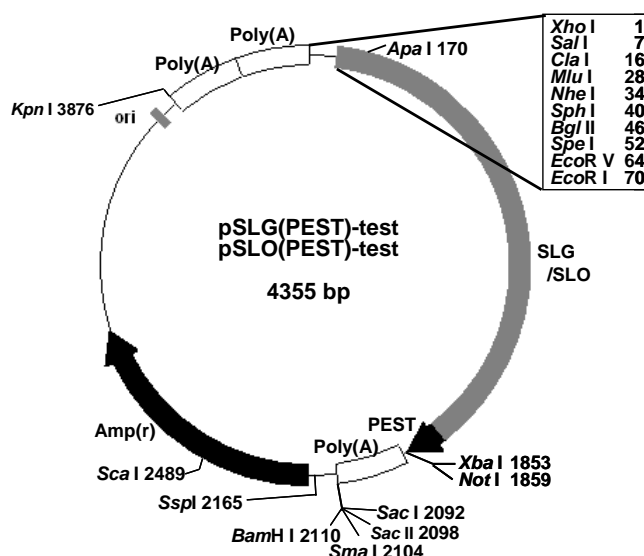
pSLG-test、pSLO-test	
Multiple cloning region	1-77
SLG/SLO gene	91-1722
SV40 late poly(A) signal	1736-1961
β-lactamase (Amp (r)) gene	2055-2915
background reduction signal	3752-4225
SLGOR-F primer	3968-3992
SLGO-R primer(complementary)	105-128

(2) pSLR-test

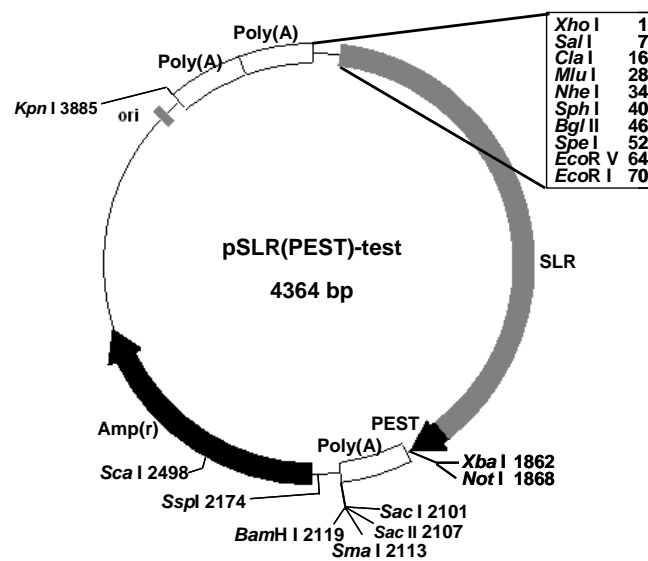
pSLR-test	
Multiple cloning region	1-77
SLR gene	91-1731
SV40 late poly(A) signal	1745-1970
β-lactamase (Amp (r)) gene	2064-2924
background reduction signal	3761-4234
SLGOR-F primer	3977-4001
SLR-R primer(complementary)	108-130

(3) pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control

pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control	
SV40 early promoter	7-207
SLG/SLO gene	276-1907
SV40 late poly(A) signal	1921-2144
SV40 enhancer	2145-2389
β-lactamase (Amp (r)) gene	2483-3343
background reduction signal	4180-4653

(4) pSLR-SV40 control

pSLR-SV40 control	
SV40 early promoter	7-207
SLR gene	276-1916
SV40 late poly(A) signal	1930-2153
SV40 enhancer	2154-2398
β-lactamase (Amp (r)) gene	2492-3352
background reduction signal	4189-4662

(5) pSLG-HSVtk control

pSLG-HSVtk control	
HSVtk promoter	7-234
SLG gene	304-1935
SV40 late poly(A) signal	1949-2174
β-lactamase (Amp (r)) gene	2268-3128
background reduction signal	3965-4438

(6) pSLG(PEST)-test, pSLO(PEST)-test

pSLG(PEST)-test, pSLO(PEST)-test	
Multiple cloning region	1-77
SLG/SLO gene	91-1719
PEST	1720-1842
SV40 late poly(A) signal	1860-2090
β-lactamase (Amp (r)) gene	2185-3045
background reduction signal	3876-4355
SLGOR-F primer	4098-4122
SLGO-R primer(complementary)	105-128

(7) pSLR(PEST)-test

pSLR(PEST)-test	
Multiple cloning region	1-77
SLR gene	91-1728
PEST	1729-1851
SV40 late poly(A) signal	1869-2099
β-lactamase (Amp (r)) gene	2194-3054
background reduction signal	3885-4364
SLGOR-F primer	4107-4131
SLR-R primer(complementary)	108-130

[6] ベクター制限酵素認識部位及び塩基配列

(1) pSLG-test、pSLO-test

表 1. pSLG-test、pSLO-test ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位	
Acc 65I	1	3746		*Bsp* CI	1	2470		*Nco* I	1	89	
Acc I	2	7	263	*Bsp* DI	1	16		*Nhe* I	1	34	
Acl I	2	2239	2612	*Bsp* MI	2	1114	651	*Not* I	1	1729	
Afl III	2	28	3730	*Bsr* BRI	2	3752	3989	*Nsp* I	2	40	3730
Ahd I	1	2837		*Bsr* DI	2	2601	2783	*Pae* R7I	1	1	
Alw 44I	2	2170	3416	*Bsr* GI	1	368		*Pci* I	1	3730	
Alw NI	2	565	3316	*Bss* SI	2	2173	3557	*Psh* BI	1	2666	
Apa I	1	170		*Bst* XI	1	83		*Psp* AI	1	1974	
Apa LI	2	2170	3416	*Bst* ZI	2	58	1730	*Pst* I	1	76	
Ase I	1	2666		*Bsu* 36I	1	192		*Pvu* I	1	2470	
Ava I	2	1	1974	*Cfr* 9I	1	1974		*Pvu* II	1	258	
Avi II	1	2617		*Cla* I	1	16		*Sac* I	1	1962	
Axy I	1	192		*Drd* I	1	3622		*Sac* II	1	1968	
Bal I	2	1016	1061	*Eag* I	2	58	1730	*Sal* I	1	7	
Bam HI	1	1980		*Eam*1105I	1	2837		*San* DI	1	128	
Ban III	1	16		*Ecl* HKI	1	2837		*Sca* I	1	2359	
Bbs I	2	1152	1630	*Eco* 52I	2	58	1730	*Sex* AI	1	1421	
Bbu I	1	40		*Eco* 81I	1	192		*Sgr* AI	2	1020	1509
Bcg I	1	2315		*Eco* ICRI	1	1962		*Sma* I	1	1974	
Bgl I	1	2718		*Eco* RI	1	70		*Spe* I	1	52	
Bgl II	1	46		*Eco* RV	1	64		*Sph* I	1	40	
Bmr I	2	2792	563	*Fsp* I	1	2617		*Ssp* I	1	2035	
Bsa AI	1	1183		*Hin*d III	1	22		*Tfi* I	2	881	923
Bsa BI	2	3752	3989	*Psp* OMI	1	170		*Vsp* I	1	2666	
Bso BI	2	1	1974	*Kpn* I	1	3746		*Xba* I	1	1723	
Bsp 106I	1	16		*Mlu* I	1	28		*Xho* I	1	1	
*Bsp*1407I	1	368		*Msc* I	2	1016	1061	*Xma* I	1	1974	

表2. pSLG-test、pSLO-testベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Acc* B7I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Asc* I	*Avr* II
Bae I	*Bbr* PI	*Bbv* CI	*Bfr* I	*Bln* I	*Blp* I	*Bpu*1102I	*Bsi* WI	*Bsm* BI	*Bsp* EI
Bss HII	*Bst*1107I	*Bst* 98I	*Bst* API	*Bst* BI	*Bst* EII	*Bst* PI	*Bst* Z17I	*Cbi* I	*Cpo* I
Csp 45I	*Csp* I	*Dra* III	*Eco* 105I	*Eco*47III	*Eco* 72I	*Eco* O65I	*Eco* T22I	*Fse* I	*IPpo* I
Lsp I	*Mro* I	*Nde* I	*Nru* I	*Nsi* I	*Nsp* V	*Pac* I	*Pfl* FI	*Pfl* MI	*Pma* CI
Pme I	*Pml* I	*Psh* AI	*Rsr* II	*Sap* I	*Sbf* I	*Sfi* I	*Sgf* I	*Sna* BI	*Srf* I
*Sse*8387I	*Stu* I	*Swa* I	*Tth* 111I	*Van* 91I					

pSLG-test ベクター配列

```
  1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
 81 gcccaccacc atggctaacg agatcatcct gcacggcgcc aagcccaggg accccctgga cctgggcacc gccggcattc
161 agctctacag ggccctgacc aacttctcct tcctgaggga ggccctgatc gacgcccaca ccgaggaggt ggtgtcttac
241 gccgacatcc tggagaacag ctgtagactg gctaagtgct acgagaacta cggcctgcgc cagaacagcg tgatctccgt
321 gtgcagcgag aatagcacca tcttcttcta ccccgtgatc gccgccctgt acatgggcgt gatcaccgcc accgtgaacg
```

401 acagctacac cgagcgggag ctgctggaga ccctgaacat ctccaagccc gaactggtgt tctgctccaa gaaggccatc
481 aagaacatga tggccctgaa gaggaacgtg aacttcatca agaaggtggt gctgctggac agcaaggagg atatgggcga
561 ggcccagtgc ctgagcaact tcatggcccg gtactccgag cccaacctgg acgtgagaaa cttcaagcca agggacttcg
641 acgccaagga gcaggtggcc cttattatgt cctcctctgg caccaccggc ctgccaaagg gcgtggtgct gacccacagg
721 aacctgagcg tgcgcttcgt ccactgcaag gacccccctgt tcggcaccag aaccatcccc tccacctcca tcctgtccat
801 cgtgcccttc caccacgcct tcggaatgtt cacaaccctg tcctacttca tcgtgggcct gagagtggtg ctgctgaaga
881 gattcgagga gaagttcttc ctgagcacca tcgagaagta cagaatccca acaatcgtgc tggcccctcc tgtgatggtg
961 ttcctggcta agagcccccct ggtggaccag tacgacctgt ccagcatcag agaggtggcc accggcggcg cccctgtggg
1041 caccgaggtt gccgtggccg tggccaagcg gctgaagatc ggcggcatcc tccagggcta cggcctgacc gagacctgct
1121 gcgccgtgct gatcaccccc cacgacgacg tgaagaccgg ctccaccggc agggtagccc cctacgtgca ggctaagatc
1201 gtggacctga ccaccggcaa gtccctggga cctaacaaga gaggcgagct gtgcttcaag agcgagatca tcatgaaggg
1281 ctacttcaac aacaagcagg ccaccgagga ggccatcgac aaggagggct ggctgcactc cggcgacgtg ggatactacg
1361 acgacgatgg acatttcttc gtggtggacc ggctgaaaga gctgatcaag tacaagggct accaggtggc ccccgccgag
1441 ctggagtggc tgctgctcca gcacccatcc atcaaggatg ccggcgtgac cggcgtgccc gacgaggccg ccggcgagct
1521 gcccggcgcc tgcatcgtgc tccaggaggg caagagcctg accgagcagg agatcatcga ctacatcgcc gagcgagtgt
1601 ctcccaccaa gcgcatccgg ggcggagtcg tcttcgtgga cgacatcccc aagggcgcca ccggcaagct ggtgagaagc
1681 gagctgcgga agctgctggc ccagaagaag tccaagctgt aatctagagc ggccgcccag acatgataag atacattgat
1761 gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt
1841 aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg
1921 aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat ggagctcccg cggcccgggg gatcctcaaa tatgtatccg
2001 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc
2081 ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag
2161 atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa
2241 cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact
2321 cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga
2401 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga
2481 ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga
2561 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac
2641 tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc
2721 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc
2801 agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg
2881 ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa
2961 cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc
3041 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct
3121 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact
3201 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc
3281 accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg
3361 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga
3441 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag
3521 gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc
3601 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc
3681 agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcggtac cgatcataat
3761 cagccatacc acatttgtag aggttttact tgctttaaaa aacctcccac acctcccccct gaacctgaaa cataaaatga
3841 atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat
3921 aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcataatcag
4001 ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tcccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg
4081 caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa
4161 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctg

pSLO-test ベクター配列

1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
81 gcccaccacc atggctaacg agatcatcct gcacggcgcc aagcccaggg acccccctgga cctgggcacc gccggcattc
161 agctctacag ggccctgacc aacttctcct tcctgaggga ggccctgatc gacgcccaca ccgaggaggt ggtgtcttac
241 gccgacatcc tggagaacag ctgtagactg gctaagtgct acgagaacta cggcctgcgc cagaacagcg tgatctccgt

321 gtgcagcgag aatagcacca tcttcttcta ccccgtgatc gccgccctgt acatgggcgt gatcaccgcc accgtgaacg
401 acagctacac cgagcgggag ctgctggaga ccctgaacat ctccaagccc gaactggtgt tctgctccaa gaaggccatc
481 aagaacatga tggccctgaa gaggaacgtg aacttcatca agaaggtggt gctgctggac agcaaggagg atatgggcga
561 ggcccagtgc ctgagcaact tcatggcccg gtactccgag cccaacctgg acgtgagaaa cttcaagcca agggacttcg
641 acgccaagga gcaggtggcc cttattatgt cctcctctgg caccaccggc ctgccaaagg gcgtggtgct gacccacagg
721 aacctgagcg tgcgcttcgt ccactgcaag gacccccctgt tcggcaacag aaccatcccc tccacctcca tcctgtccat
801 cgtgcccttc caccacgcct tcggaatgtt cacaaccctg tcctacttca tcgtgggcct gagagtggtg ctgctgaaga
881 gattcgagga gaagttcttc ctgagcacca tcgagaagta cagaatccca acaatcgtgc tggcccctcc tgtgatggtg
961 ttcctggcta agagcccccct ggtggaccag tacgacctgt ccagcatcag agaggtggcc accggcggcg cccctgtggg
1041 caccgaggtt gccgtggccg tggccaagcg gctgaagatc ggcggcatcc tccagggcta cggcctgacc gagacctgct
1121 gcgccgtgct gatcaccccc cacgacgacg tgaagaccgg ctccaccggc agggtagccc cctacgtgca ggctaagatc
1201 gtggacctga ccaccggcaa gtccctggga cctaacaaga gaggcgagct gtgcttcaag agcgagatca tcatgaaggg
1281 ctacttcaac aacaagcagg ccaccgagga ggccatcgac aaggagggct ggctgcactc cggcgacgtg ggatactacg
1361 acgacgatgg acatttcttc gtggtggacc ggctgaaaga gctgatcaag tacaagggct accaggtggc cccgccgag
1441 ctggagtggc tgctgctcca gcacccatcc atcaaggatg ccggcgtgac cggcgtgccc gacgaggccg ccggcgagct
1521 gcccggcgcc tgcatcgtgc tccaggaggg caagagcctg accgagcagg agatcatcga ctacatcgcc gagcgagtgt
1601 ctcccaccaa gcgcatccgg ggcggagtcg tcttcgtgga cgacatcccc aagggcgcca ccggcaagct ggtgagaagc
1681 gagctgcgga agctgctggc ccagaagaag tccaagctgt aatctagagc ggccgcccag acatgataag atacattgat
1761 gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt
1841 aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg
1921 aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat ggagctcccg cggcccgggg gatcctcaaa tatgtatccg
2001 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc
2081 ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag
2161 atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa
2241 cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact
2321 cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga
2401 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga
2481 ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga
2561 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac
2641 tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc
2721 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc
2801 agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg
2881 ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa
2961 cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc
3041 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct
3121 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact
3201 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc
3281 accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg
3361 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga
3441 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag
3521 gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc
3601 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc
3681 agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcggtac cgatcataat
3761 cagccatacc acatttgtag aggttttact tgctttaaaa aacctcccac acctcccccct gaacctgaaa cataaaatga
3841 atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat
3921 aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcataatcag
4001 ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tcccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg
4081 caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa
4161 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctg

(2) pSLR-test

表1．pSLR-test ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位	
Acc 65I	1	3755		*Bst* EII	1	1599		*Nhe* I	1	34	
Acc I	1	7		*Bst* PI	1	1599		*Not* I	1	1738	
Acl I	2	2248	2621	*Bst* XI	1	83		*Nsp* V	1	250	
Afl III	2	28	3739	*Bst* ZI	2	58	1739	*Pae* R7I	1	1	
Ahd I	2	1070	2846	*Bsu* 36I	1	694		*Pci* I	1	3739	
Alw 44I	2	2179	3425	*Cbi* I	1	250		*Ple* I	2	2852	3369
Apa LI	2	2179	3425	*Cfr* 9I	1	1983		*Psh* BI	1	2675	
Ase I	1	2675		*Cla* I	1	16		*Psp* 1406I	2	2248	2621
Avi II	1	2626		*Csp* 45I	1	250		*Psp* AI	1	1983	
Axy I	1	694		*Drd* I	1	3631		*Pvu* I	2	117	2479
Bam HI	1	1989		*Eag* I	2	58	1739	*Pvu* II	2	160	1519
Ban III	1	16		*Eam* 1104I	2	97	2057	*Sac* I	1	1971	
Bbe I	1	1162		*Eam* 1105I	2	1070	2846	*Sac* II	1	1977	
Bbs I	1	903		*Ear* I	2	97	2057	*Sal* I	1	7	
Bbu I	1	40		*Ecl* HKI	2	1070	2846	*Sbf* I	1	1089	
Bbv CI	1	1686		*Eco* 52I	2	58	1739	*Sca* I	1	2368	
Bci VI	2	2003	3530	*Eco* 81I	1	694		*Sex* AI	1	1424	
Bcl I	2	662	707	*Eco* ICRI	1	1971		*Sfo* I	1	1162	
Bgl I	2	1658	2727	*Eco* O65I	1	1599		*Sgf* I	1	116	
Bgl II	1	46		*Eco* RI	1	70		*Sgr* AI	1	1341	
Bmr I	1	2801		*Eco* RV	1	64		*Sma* I	1	1983	
Bsa I	2	2779	1111	*Eco* T14I	1	89		*Spe* I	1	52	
Bse RI	1	944		*Ehe* I	1	1162		*Sph* I	1	40	
Bsp 106I	1	16		*Fba* I	2	662	707	*Sse* 8387I	1	1089	
Bsp 1407I	1	404		*Fsp* I	1	2626		*Ssp* I	1	2044	
Bsp CI	2	117	2479	*Hin*d III	1	22		*Sty* I	1	89	
Bsp DI	1	16		*Kas* I	1	1162		*Vsp* I	1	2675	
Bsp MI	1	1616		*Kpn* I	1	3755		*Xba* I	1	1732	
Bsr BI	2	1736	2007	*Lsp* I	1	250		*Xcm* I	2	968	1307
Bsr DI	2	2610	2792	*Mlu* I	1	28		*Xho* I	1	1	
Bsr GI	1	404		*Mly* I	2	3369	2852	*Xma* I	1	1983	
Bss SI	2	2182	3566	*Nar* I	1	1162		*Xmn* I	1	2247	
Bst BI	1	250		*Nco* I	1	89					

表 2. pSLR-test ベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Acc* B7I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Apa* I	*Asc* I
Avr II	*Bae* I	*Bbr* PI	*Bfr* I	*Bln* I	*Blp* I	*Bpu* 1102I	*Bsa* AI	*Bsi* WI	*Bsm* BI
Bsp EI	*Bss* HII	*Bst* 1107I	*Bst* 98I	*Bst* API	*Bst* Z17I	*Btr* I	*Cpo* I	*Csp* I	*Dra* III
Eco 105I	*Eco* 47III	*Eco* 72I	*Eco* O109I	*Eco* T22I	*Fse* I	*IPpo* I	*Mro* I	*Nde* I	*Nru* I
Nsi I	*Pac* I	*Pfl* FI	*Pfl* MI	*Pma* CI	*Pme* I	*Pml* I	*Ppu* MI	*Psh* AI	*Psp* OMI
Rsr II	*San* DI	*Sap* I	*Sfi* I	*Sna* BI	*Srf* I	*Stu* I	*Swa* I	*Tth* 111I	*Van* 91I

pSLR-test ベクター配列

```
  1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
 91 gcccaccacc atggaagaag agaacatcgt gaatggcgat cgccctcggg atctggtgtt ccctggcaca gccggcctgc
161 agctgtatca gtccctgtat aaatactctt acatcaccga cggaatcatc gacgcccaca ccaacgaggt gatctcctat
241 gcccagattt tcgaaacaag ttgccgcctg gccgtgagcc tggagaagta tggcctggat cacaacaacg tggtggccat
```

321 ttgcagcgag aacaacatcc acttcttcgg ccctctgatc gctgccctat accaggggat tccaatggcc acatccaacg
401 atatgtacac cgagagggag atgatcggcc acctgaacat ctccaagcca tgtctgatgt tctgttccaa gaagtccctg
481 ccattcatcc tgaaggtgca gaagcacctg gactttctca agaaggtgat cgtgatcgac agcatgtacg acatcaacgg
561 cgtggagtgc gtgttcagtt tcgtgtcccg gtacaccgat catgcgttcg atccagtgaa gttcaaccct aaagagtttg
641 atcccctgga gagaaccgcg ctgatcatga catcctctgg aacaaccggc ctgcctaagg gcgtggtgat cagccacagg
721 agcatcacca tcagattcgt ccacagcagc gatcccatct acggcacccg catcgcccca gatacatcca tcctggccat
801 cgcccctttc caccacgcct tcggactgtt taccgccctg gcttactttc cagtgggcct gaagatcgtg atggtgaaaa
881 agtttgaggg cgagttcttc ctgaagacca tccagaacta caagatcgct tctatcgtgg tgcctcctcc aatcatggtg
961 tatctggcca agagccctct ggtggatgag tacaatctgt ccagcctgac agagatcgcc tgtggcggct cccctctggg
1041 cagagacatc gccgacaagg tggccaagag actgaaggtc cacggcatcc tgcagggcta tggcctgacc gagacctgta
1121 gcgccctgat cctgagcccc aacgatagag agctgaagaa gggcgccatc ggcaccccta tgccctatgt ccaggtgaag
1201 gtgattgaca tcaacaccgg caaagccctg ggaccaagag agaagggcga gatttgcttc aagagccaga tgctgatgaa
1281 gggctaccac aacaacccac aggccaccag ggatgccctg gacaaggacg ggtggctgca caccggcgat ctgggctact
1361 acgacgagga cagattcatc tatgtggtgg atcggctgaa agaactcatc aagtacaagg gctaccaggt ggcccctgcc
1441 gagctggaga acttgcttct gcagcaccct aacatctctg atgccggcgt catcggcatc ccagacgagt ttgccggcca
1521 gctgccttcc gcctgtgtcg tgctggagcc tggcaagacc atgaccgaga aggaggtgca ggattatatc gccgagctgg
1601 tgaccaccac caagcacctg cggggcggcg tggtgttcat cgacagcatt ccgaaaggcc caacaggcaa gctgatgaga
1681 aacgagctga gggccatctt tgcccgcgag caggccaagt ccaagctgta atctagagcg gccgcccaga catgataaga
1761 tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc
1841 tttatttgta accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg
1921 aggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtatg gagctcccgc ggcccggggg atcctcaaat
2002 atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt
2081 ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag
2161 atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc
2241 cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca
2321 agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg
2401 atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg
2481 atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga
2561 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa
2641 ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg
2721 cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc
2801 actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata
2881 gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt
2961 gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg
3041 tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa
3121 tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg
3201 aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa
3281 ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta
3361 ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc
3441 ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa
3521 ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc
3601 tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg
3681 aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcggtacc
3761 gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac
3841 ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat
3921 ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctggat
4001 cataatcagc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct ccccctgaac ctgaaacata
4081 aaatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc
4161 acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctg

(3) pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control

表 1. pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control ベクターを 1～5 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位	
Aat I	1	188		*Bsr* DI	2	3029	3211	*Nsi* I	2	2242	2314
Acc 65I	1	4174		*Bsr* GI	1	553		*Pae* R7I	1	1	
Acc I	1	448		*Bss* SI	2	2601	3985	*Pci* I	1	4158	
Acl I	2	2667	3040	*Bst* API	2	2244	2316	*Psh* BI	1	3094	
Afl III	2	213	4158	*Bst* XI	1	268		*Psp* 1406I	2	2667	3040
Ahd I	1	3265		*Bst* ZI	2	243	1915	*Psp* AI	1	2402	
Alw 44I	2	2598	3844	*Bsu* 36I	1	377		*Psp* OMI	1	355	
Alw NI	2	750	3744	*Cfr* 9I	1	2402		*Pst* I	1	261	
Apa I	1	355		*Drd* I	1	4050		*Pvu* I	1	2898	
Apa LI	2	2598	3844	*Eag* I	2	243	1915	*Pvu* II	1	443	
Ase I	1	3094		*Eam* 1105I	1	3265		*Sac* I	1	2390	
Ava I	2	1	2402	*Ecl* HKI	1	3265		*Sac* II	1	2396	
Avi II	1	3045		*Eco* 52I	2	243	1915	*San* DI	1	313	
Avr II	1	191		*Eco* 81I	1	377		*Sca* I	1	2787	
Axy I	1	377		*Eco* ICRI	1	2390		*Sex* AI	2	1606	2292
Bal I	2	1201	1246	*Eco* RI	1	255		*Sfi* I	1	137	
Bam HI	1	2408		*Eco* RV	1	249		*Sgr* AI	2	1205	1694
Bbs I	2	1337	1815	*Eco* T22I	2	2242	2314	*Sma* I	1	2402	
Bcg I	1	2743		*Fsp* I	1	3045		*Spe* I	1	237	
Bgl I	2	138	3146	*Hind* III	1	207		*Ssp* I	1	2463	
Bln I	1	191		*Kpn* I	1	4174		*Stu* I	1	188	
Bsa AI	1	1368		*Mlu* I	1	213		*Tfi* I	2	1066	1108
Bso BI	2	1	2402	*Msc* I	2	1201	1246	*Vsp* I	1	3094	
Bsp 1407I	1	553		*Nco* I	1	274		*Xba* I	1	1908	
Bsp CI	1	2898		*Nhe* I	1	219		*Xho* I	1	1	
Bsp MI	2	1299	836	*Not* I	1	1914		*Xma* I	1	2402	

表 2. pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control ベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat II	*Acc* B7I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Asc* I	*Bae* I	*Bae* I
Ban III	*Bbr* PI	*Bbv* CI	*Bfr* I	*Blp* I	*Bpu* 1102I	*Bsi* WI	*Bsm* BI	*Bsp* 106I	*Bsp* DI
Bsp EI	*Bss* HII	*Bst* 1107I	*Bst* 98I	*Bst* BI	*Bst* EII	*Bst* PI	*Bst* Z17I	*Cbi* I	*Cla* I
Cpo I	*Csp* 45I	*Csp* I	*Dra* III	*Eco* 105I	*Eco* 47III	*Eco* 72I	*Eco* O65I	*Fse* I	*IPpo* I
Lsp I	*Mro* I	*Nde* I	*Nru* I	*Nsp* V	*Pac* I	*Pfl* FI	*Pfl* MI	*Pma* CI	*Pme* I
Pml I	*Psh* AI	*Rsr* II	*Sal* I	*Sap* I	*Sbf* I	*Sgf* I	*Sna* BI	*Srf* I	*Sse* 8387I
Swa I	*Tth* 111I	*Van* 91I							

pSLG-SV40 control ベクター配列

```
  1 ctcgagatct gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt
 81 tccgcccatt ctccgcccca tcgctgacta attttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt
161 ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc ttacgcgtgc tagcgcatgc agatctacta
241 gtcggccgga tatcgaattc ctgcagccca ccaccatggc taacgagatc atcctgcacg gcgccaagcc cagggacccc
321 ctggacctgg gcaccgccgg cattcagctc tacagggccc tgaccaactt ctccttcctg agggaggccc tgatcgacgc
401 ccacaccgag gaggtggtgt cttacgccga catcctggag aacagctgta gactggctaa gtgctacgag aactacggcc
481 tgcgccagaa cagcgtgatc tccgtgtgca gcgagaatag caccatcttc ttctaccccg tgatcgccgc cctgtacatg
561 ggcgtgatca ccgccaccgt gaacgacagc tacaccgagc gggagctgct ggagaccctg aacatctcca agcccgaact
641 ggtgttctgc tccaagaagg ccatcaagaa catgatggcc ctgaagagga acgtgaactt catcaagaag gtggtgctgc
721 tggacagcaa ggaggatatg ggcgaggccc agtgcctgag caacttcatg gcccggtact ccgagcccaa cctggacgtg
801 agaaacttca agccaaggga cttcgacgcc aaggagcagg tggcccttat tatgtcctcc tctggcacca ccggcctgcc
```

```
 881 aaagggcgtg gtgctgaccc acaggaacct gagcgtgcgc ttcgtccact gcaaggaccc cctgttcggc accagaacca
 961 tcccctccac ctccatcctg tccatcgtgc ccttccacca cgccttcgga atgttcacaa ccctgtccta cttcatcgtg
1041 ggcctgagag tggtgctgct gaagagattc gaggagaagt tcttcctgag caccatcgag aagtacagaa tcccaacaat
1121 cgtgctggcc cctcctgtga tggtgttcct ggctaagagc ccccctggtgg accagtacga cctgtccagc atcagagagg
1201 tggccaccgg cggcgcccct gtgggcaccg aggttgccgt ggccgtggcc aagcggctga agatcggcgg catcctccag
1281 ggctacggcc tgaccgagac ctgctgcgcc gtgctgatca ccccccacga cgacgtgaag accggctcca ccggcagggt
1361 agccccctac gtgcaggcta agatcgtgga cctgaccacc ggcaagtccc tgggacctaa caagagaggc gagctgtgct
1441 tcaagagcga gatcatcatg aagggctact tcaacaacaa gcaggccacc gaggaggcca tcgacaagga gggctggctg
1521 cactccggcg acgtgggata ctacgacgac gatggacatt tcttcgtggt ggaccggctg aaagagctga tcaagtacaa
1601 gggctaccag gtggcccccg ccgagctgga gtggctgctg ctccagcacc catccatcaa ggatgccggc gtgaccggcg
1681 tgcccgacga ggccgccggc gagctgcccg gcgcctgcat cgtgctccag gagggcaaga gcctgaccga gcaggagatc
1761 atcgactaca tcgccgagcg agtgtctccc accaagcgca tccggggcgg agtcgtcttc gtggacgaca tccccaaggg
1841 cgccaccggc aagctggtga gaagcgagct gcggaagctg ctggcccaga agaagtccaa gctgtaatct agagcggccg
1921 cccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa
2001 tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacaa gttaacaaca acaattgcat tcattttatg
2081 tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtagatctg aacgatggag
2161 cggagaatgg gcggaactgg gcggagttag gggcgggatg ggcggagtta ggggcgggac tatggttgct gactaattga
2241 gatgcatgct ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca cacctggttg ctgactaatt gagatgcatg
2321 ctttgcatac ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacaccctaa ctgacacaca ttccacagcg agctcccgcg
2401 gcccggggga tcctcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga
2481 gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa
2561 acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa
2641 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat
2721 cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc
2801 acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc
2881 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc
2961 ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca
3041 acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa
3121 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt
3201 ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca
3281 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta
3361 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca
3441 tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat
3521 cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga
3601 gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt
3681 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt
3761 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg
3841 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca
3921 cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca
4001 gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc
4081 aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca
4161 tgttctttcc tgcggtaccg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac
4241 ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata
4321 aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg
4401 tatcttatca tgtctggatc ataatcagcc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc
4481 cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttgttg ttaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaaataaag
4561 caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat
4641 cttatcatgt ctg
```

pSLO-SV40 control ベクター配列

```
   1 ctcgagatct gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt
  81 tccgcccatt ctccgcccca tcgctgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt
 161 ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc ttacgcgtgc tagcgcatgc agatctacta
 241 gtcggccgga tatcgaattc ctgcagccca ccaccatggc taacgagatc atcctgcacg gcgccaagcc caggaccccc
 321 ctggacctgg gcaccgccgg cattcagctc tacagggccc tgaccaactt ctccttcctg agggaggccc tgatcgacgc
```

401 ccacaccgag gaggtggtgt cttacgccga catcctggag aacagctgta gactggctaa gtgctacgag aactacggcc
481 tgcgccagaa cagcgtgatc tccgtgtgca gcgagaatag caccatcttc ttctaccccg tgatcgccgc cctgtacatg
561 ggcgtgatca ccgccaccgt gaacgacagc tacaccgagc gggagctgct ggagaccctg aacatctcca agcccgaact
641 ggtgttctgc tccaagaagg ccatcaagaa catgatggcc ctgaagagga acgtgaactt catcaagaag gtggtgctgc
721 tggacagcaa ggaggatatg ggcgaggccc agtgcctgag caacttcatg gcccggtact ccgagcccaa cctggacgtg
801 agaaacttca agccaaggga cttcgacgcc aaggagcagg tggcccttat tatgtcctcc tctggcacca ccggcctgcc
881 aaagggcgtg gtgctgaccc acaggaacct gagcgtgcgc ttcgtccact gcaaggaccc cctgttcggc aacagaacca
961 tcccctccac ctccatcctg tccatcgtgc ccttccacca cgccttcgga atgttcacaa ccctgtccta cttcatcgtg
1041 ggcctgagag tggtgctgct gaagagattc gaggagaagt tcttcctgag caccatcgag aagtacagaa tcccaacaat
1121 cgtgctggcc cctcctgtga tggtgttcct ggctaagagc ccccctggtgg accagtacga cctgtccagc atcagagagg
1201 tggccaccgg cggcgcccct gtgggcaccg aggttgccgt ggccgtggcc aagcggctga agatcggcgg catcctccag
1281 ggctacggcc tgaccgagac ctgctgcgcc gtgctgatca cccccacga cgacgtgaag accggctcca ccggcagggt
1361 agcccctac gtgcaggcta agatcgtgga cctgaccacc ggcaagtccc tgggacctaa caagagaggc gagctgtgct
1441 tcaagagcga gatcatcatg aagggctact tcaacaacaa gcaggccacc gaggaggcca tcgacaagga gggctggctg
1521 cactccggcg acgtgggata ctacgacgac gatggacatt tcttcgtggt ggaccggctg aaagagctga tcaagtacaa
1601 gggctaccag gtggcccccg ccgagctgga gtggctgctg ctccagcacc catccatcaa ggatgccggc gtgaccggcg
1681 tgcccgacga ggccgccggc gagctgcccg gcgcctgcat cgtgctccag gagggcaaga gcctgaccga gcaggagatc
1761 atcgactaca tcgccgagcg agtgtctccc accaagcgca tccggggcgg agtcgtcttc gtggacgaca tccccaaggg
1841 cgccaccggc aagctggtga gaagcgagct gcggaagctg ctggcccaga agaagtccaa gctgtaatct agagcggccg
1921 cccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa
2001 tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacaa gttaacaaca acaattgcat tcattttatg
2081 tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtagatctg aacgatggag
2161 cggagaatgg gcggaactgg gcggagttag gggcgggatg ggcggagtta ggggcgggac tatggttgct gactaattga
2241 gatgcatgct ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca cacctggttg ctgactaatt gagatgcatg
2321 ctttgcatac ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacaccctaa ctgacacaca ttccacagcg agctcccgcg
2401 gcccggggga tcctcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga
2481 gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa
2561 acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa
2641 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat
2721 cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc
2801 acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc
2881 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc
2961 ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca
3041 acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa
3121 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt
3201 ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca
3281 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta
3361 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca
3441 tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat
3521 cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga
3601 gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt
3681 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt
3761 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg
3841 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca
3921 cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca
4001 gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc
4081 aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca
4161 tgttctttcc tgcggtaccg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac
4241 ctcccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata
4321 aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg
4401 tatcttatca tgtctggatc ataatcagcc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc
4481 cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttgttg ttaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaaataaag
4561 caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat
4641 cttatcatgt ctg

(4) pSLR-SV40 control

表 1. pSLR-SV40 control ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位	
Aat I	1	188	
Acc 65I	1	4183	
Acl I	2	2676	3049
Ahd I	2	1255	3274
Alw 44I	2	2607	3853
Apa LI	2	2607	3853
Ase I	1	3103	
Avi II	1	3054	
Avr II	1	191	
Axy I	1	879	
Bam HI	1	2417	
Bbe I	1	1347	
Bbs I	1	1088	
Bbv CI	1	1871	
Bci VI	2	2431	3958
Bcl I	2	847	892
Bln I	1	191	
Bsa I	2	3207	1296
Bse RI	2	172	1129
Bsp 1407I	1	589	
Bsp CI	2	302	2907
Bsp MI	1	1801	
Bsr DI	2	3038	3220
Bsr GI	1	589	
Bss SI	2	2610	3994
Bst API	2	2253	2325
Bst BI	1	435	
Bst EII	1	1784	
Bst PI	1	1784	
Bst XI	1	268	
Bst ZI	2	243	1924
Bsu 36I	1	879	
Csp 45I	1	435	
Cbi I	1	435	
Cfr 9I	1	2411	
Drd I	1	4059	
Eag I	2	243	1924
Eam 1104I	2	282	2485
Eam 1105I	2	1255	3274
Ear I	2	282	2485
Ecl HKI	2	1255	3274
Eco 52I	2	243	1924
Eco 81I	1	879	
Eco ICRI	1	2399	
Eco O65I	1	1784	
Eco RI	1	255	
Eco RV	1	249	
Eco T14I	2	191	274
Eco T22I	2	2251	2323
Ehe I	1	1347	
Fba I	2	847	892
Fsp I	1	3054	
*Hin*d III	1	207	
Kas I	1	1347	
Kpn I	1	4183	
Lsp I	1	435	
Mlu I	2	213	787
Mly I	2	3797	3280
Nar I	1	1347	
Nco I	1	274	
Nhe I	1	219	
Not I	1	1923	
Nsi I	2	2251	2323
Nsp V	1	435	
Pae R7I	1	1	
Pci I	1	4167	
Ple I	2	3280	3797
Psh BI	1	3103	
Psp 1406I	2	2676	3049
Psp AI	1	2411	
Pvu I	2	302	2907
Pvu II	2	345	1704
Sac I	1	2399	
Sac II	1	2405	
Sbf I	1	1274	
Sca I	1	2796	
Sex AI	2	1609	2301
Sfi I	1	137	
Sfo I	1	1347	
Sgf I	1	301	
Sgr AI	1	1526	
Sma I	1	2411	
Spe I	1	237	
Sse 8387I	1	1274	
Ssp I	1	2472	
Stu I	1	188	
Sty I	2	191	274
Vsp I	1	3103	
Xba I	1	1917	
Xcm I	2	1153	1492
Xho I	1	1	
Xma I	1	2411	
Xmn I	1	2675	

表 2. pSLR-SV40 control ベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat II	*Acc* B7I	*Acc* I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Apa* I	*Asc* I
Bae I	*Ban* III	*Bbr* PI	*Bfr* I	*Blp* I	*Bpu* 1102I	*Bsa* AI	*Bsi* WI	*Bsm* BI	*Bsp* 106I
Bsp DI	*Bsp* EI	*Bss* HII	*Bst* 1107I	*Bst* 98I	*Bst* Z17I	*Btr* I	*Cla* I	*Cpo* I	*Csp* I
Dra III	*Eco* 105I	*Eco* 47III	*Eco* 72I	*Eco* O109I	*Fse* I	*IPpo* I	*Mro* I	*Nde* I	*Nru* I
Pac I	*Pfl* FI	*Pfl* MI	*Pma* CI	*Pme* I	*Pml* I	*Ppu* MI	*Psh* AI	*Psp* OMI	*Rsr* II
Sal I	*San* DI	*Sap* I	*Sna* BI	*Srf* I	*Swa* I	*Tth* 111I	*Van* 91I		

pSLR-SV40 control ベクター配列

```
  1 ctcgagatct gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt
 81 tccgcccatt ctccgcccca tcgctgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt
161 ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc ttacgcgtgc tagcgcatgc agatctacta
241 gtcggccgga tatcgaattc ctgcagccca ccaccatgga agaagagaac atcgtgaatg gcgatcgccc tcgggatctg
321 gtgttccctg gcacagccgg cctgcagctg tatcagtccc tgtataaata ctcttacatc accgacggaa tcatcgacgc
401 ccacaccaac gaggtgatct cctatgccca gattttcgaa acaagttgcc gcctggccgt gagcctggag aagtatggcc
481 tggatcacaa caacgtggtg gccatttgca gcgagaacaa catccacttc ttcggccctc tgatcgctgc cctataccag
561 gggattccaa tggccacatc caacgatatg tacaccgaga gggagatgat cggccacctg aacatctcca agccatgtct
```

641 gatgttctgt tccaagaagt ccctgccatt catcctgaag gtgcagaagc acctggactt tctcaagaag gtgatcgtga
721 tcgacagcat gtacgacatc aacggcgtgg agtgcgtgtt cagtttcgtg tcccggtaca ccgatcatgc gttcgatcca
801 gtgaagttca accctaaaga gtttgatccc ctggagagaa ccgcgctgat catgacatcc tctggaacaa ccggcctgcc
881 taagggcgtg gtgatcagcc acaggagcat caccatcaga ttcgtccaca gcagcgatcc catctacggc acccgcatcg
961 ccccagatac atccatcctg gccatcgccc ctttccacca cgccttcgga ctgtttaccg ccctggctta ctttccagtg
1041 ggcctgaaga tcgtgatggt gaaaaagttt gagggcgagt tcttcctgaa gaccatccag aactacaaga tcgcttctat
1121 cgtggtgcct cctccaatca tggtgtatct ggccaagagc cctctggtgg atgagtacaa tctgtccagc ctgacagaga
1201 tcgcctgtgg cggctcccct ctgggcagag acatcgccga caaggtggcc aagagactga aggtccacgg catcctgcag
1281 ggctatggcc tgaccgagac ctgtagcgcc ctgatcctga gccccaacga tagagagctg aagaagggcg ccatcggcac
1361 ccctatgccc tatgtccagg tgaaggtgat tgacatcaac accggcaaag ccctgggacc aagagagaag ggcgagattt
1441 gcttcaagag ccagatgctg atgaagggct accacaacaa cccacaggcc accagggatg ccctggacaa ggacgggtgg
1521 ctgcacaccg gcgatctggg ctactacgac gaggacagat tcatctatgt ggtggatcgg ctgaaagaac tcatcaagta
1601 caagggctac caggtggccc ctgccgagct ggagaacttg cttctgcagc accctaacat ctctgatgcc ggcgtcatcg
1681 gcatcccaga cgagtttgcc ggccagctgc cttccgcctg tgtcgtgctg gagcctggca agaccatgac cgagaaggag
1761 gtgcaggatt atatcgccga gctggtgacc accaccaagc acctgcgggg cggcgtggtg ttcatcgaca gcattccgaa
1841 aggcccaaca ggcaagctga tgagaaacga gctgagggcc atctttgccc gcgagcaggc caagtccaag ctgtaatcta
1921 gagcggccgc ccagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta
2001 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt
2081 cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtagatctga
2161 acgatggagc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag gggcgggact atggttgctg
2241 actaattgag atgcatgctt tgcatacttc tgcctgctgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc tgactaattg
2321 agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct ggggagcctg gggactttcc acaccctaac tgacacacat tccacagcga
2401 gctcccgcgg cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa
2481 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct
2561 cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa
2641 cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg
2721 cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac
2801 tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa
2881 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg
2961 taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca
3041 atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga
3121 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg
3201 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg
3281 agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga
3361 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg
3441 ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct
3521 tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc
3601 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt
3681 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct
3761 gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg
3841 aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag
3921 aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg
4001 gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg
4081 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt
4161 ttgctcacat gttctttcct gcggtaccga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac
4241 ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg
4321 ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac
4401 tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc
4481 ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta
4561 caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca
4641 tcaatgtatc ttatcatgtc tg

(5) pSLG-HSVtk control

表 1. pSLG-HSVtk ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位	
Acc 65I	1	3959		*Bsr* DI	2	2814	2996	*Not* I	1	1942	
Acc I	1	476		*Bsr* GI	1	581		*Nsp* V	1	127	
Acl I	2	2452	2825	*Bss* SI	2	2386	3770	*Pae* R7I	1	1	
Ahd I	1	3050		*Bst* BI	1	127		*Pci* I	1	3943	
Alw 44I	2	2383	3629	*Bst* XI	1	296		*Psp* AI	1	2187	
Alw NI	2	778	3529	*Bst* ZI	2	271	1943	*Psp* OMI	1	383	
Apa I	1	383		*Bsu* 36I	1	405		*Pst* I	2	217	289
Apa LI	2	2383	3629	*Cbi* I	1	127		*Psh* BI	1	2879	
Ase I	1	2879		*Cfr* 9I	1	2187		*Psp* 1406I	2	2452	2825
Ava I	2	1	2187	*Csp* 45I	1	127		*Pvu* I	1	2683	
Avi II	1	2830		*Drd* I	1	3835		*Pvu* II	1	471	
Axy I	1	405		*Eag* I	2	271	1943	*Sac* I	1	2175	
Bal I	2	1229	1274	*Eam* 1105I	1	3050		*Sac* II	1	2181	
Bam HI	1	2193		*Ecl* HKI	1	3050		*San* DI	1	341	
Bbs I	2	1365	1843	*Eco* 52I	2	271	1943	*Sca* I	1	2572	
Bbu I	1	253		*Eco* 81I	1	405		*Sex* AI	1	1634	
Bcg I	1	2528		*Eco* ICRI	1	2175		*Sgr* AI	2	1233	1722
Bgl I	1	2931		*Eco* RI	2	124	283	*Sma* I	1	2187	
Bgl II	1	259		*Eco* RV	1	277		*Spe* I	1	265	
Bmr I	2	3005	776	*Fsp* I	1	2830		*Sph* I	1	253	
Bsa AI	1	1396		*Hind* III	1	235		*Ssp* I	1	2248	
Bsa BI	2	3965	4202	*Kpn* I	1	3959		*Tfi* I	2	1094	1136
Bso BI	2	1	2187	*Lsp* I	1	127		*Vsp* I	1	2879	
Bsp 1407I	1	581		*Mlu* I	2	188	241	*Xba* I	1	1936	
Bsp CI	1	2683		*Msc* I	2	1229	1274	*Xho* I	1	1	
Bsp MI	2	1327	864	*Nco* I	1	302		*Xma* I	1	2187	
Bsr BRI	2	3965	4202	*Nhe* I	1	247					

表 2. pSLG-HSVtk ベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Acc* B7I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Asc* I	*Avr* II
Bae I	*Bae* I	*Ban* III	*Bbr* PI	*Bbv* CI	*Bfr* I	*Bln* I	*Blp* I	*Bpu* 1102I	*Bsi* WI
Bsm BI	*Bsp* 106I	*Bsp* DI	*Bsp* EI	*Bss* HII	*Bst* 1107I	*Bst* 98I	*Bst* API	*Bst* EII	*Bst* PI
Bst Z17I	*Cla* I	*Cpo* I	*Csp* I	*Dra* III	*Eco* 105I	*Eco* 47III	*Eco* 72I	*Eco* O65I	*Eco* T22I
Fse I	*IPpo* I	*Mro* I	*Nde* I	*Nru* I	*Nsi* I	*Pac* I	*Pfl* FI	*Pfl* MI	*Pma* CI
Pme I	*Pml* I	*Psh* AI	*Rsr* II	*Sal* I	*Sap* I	*Sbf* I	*Sfi* I	*Sgf* I	*Sna* BI
Srf I	*Sse* 8387I	*Stu* I	*Swa* I	*Tth* 111I	*Van* 91I				

pSLG-HSVtk ベクター配列

```
  1 ctcgagctgc ttcatccccg tggcccgttg ctcgcgtttg ctggcggtgt ccccggaaga aatatatttg catgtcttta
 81 gttctatgat gacacaaacc ccgcccagcg tcttgtcatt ggcgaattcg aacacgcaga tgcagtcggg gcggcgcggt
161 cccaggtcca cttcgcatat taaggtgacg cgtgtggcct cgaacaccga gcgaccctgc agcgacccgc ttaaaagctt
241 acgcgtgcta gcgcatgcag atctactagt cggccggata tcgaattcct gcagcccacc accatggcta acgagatcat
321 cctgcacggc gccaagccca gggacccct ggacctgggc accgccggca ttcagctcta cagggccctg accaacttct
401 ccttcctgag ggaggccctg atcgacgccc acaccgagga ggtggtgtct tacgccgaca tcctggagaa cagctgtaga
481 ctggctaagt gctacgagaa ctacggcctg cgccagaaca gcgtgatctc cgtgtgcagc gagaatagca ccatcttctt
561 ctaccccgtg atcgccgccc tgtacatggg cgtgatcacc gccaccgtga acgacagcta caccgagcgg gagctgctgg
641 agaccctgaa catctccaag cccgaactgg tgttctgctc caagaaggcc atcaagaaca tgatggccct gaagaggaac
721 gtgaacttca tcaagaaggt ggtgctgctg gacagcaagg aggatatggg cgaggcccag tgcctgagca acttcatggc
801 ccggtactcc gagcccaacc tggacgtgag aaacttcaag ccaagggact tcgacgccaa ggagcaggtg gcccttatta
```

881 tgtcctcctc tggcaccacc ggcctgccaa agggcgtggt gctgacccac aggaacctga gcgtgcgctt cgtccactgc
961 aaggaccccc tgttcggcac cagaaccatc ccctccacct ccatcctgtc catcgtgccc ttccaccacg ccttcggaat
1041 gttcacaacc ctgtcctact tcatcgtggg cctgagagtg gtgctgctga agagattcga ggagaagttc ttcctgagca
1121 ccatcgagaa gtacagaatc ccaacaatcg tgctggcccc tcctgtgatg gtgttcctgg ctaagagccc cctggtggac
1201 cagtacgacc tgtccagcat cagagaggtg gccaccggcg gcgcccctgt gggcaccgag gttgccgtgg ccgtggccaa
1281 gcggctgaag atcggcggca tcctccaggg ctacggcctg accgagacct gctgcgccgt gctgatcacc ccccacgacg
1361 acgtgaagac cggctccacc ggcagggtag ccccctacgt gcaggctaag atcgtggacc tgaccaccgg caagtccctg
1441 ggacctaaca agagaggcga gctgtgcttc aagagcgaga tcatcatgaa gggctacttc aacaacaagc aggccaccga
1521 ggaggccatc gacaaggagg gctggctgca ctccggcgac gtgggatact acgacgacga tggacatttc ttcgtggtgg
1601 accggctgaa agagctgatc aagtacaagg gctaccaggt ggcccccgcc gagctggagt ggctgctgct ccagcaccca
1681 tccatcaagg atgccggcgt gaccggcgtg cccgacgagg ccgccggcga gctgcccggc gcctgcatcg tgctccagga
1761 gggcaagagc ctgaccgagc aggagatcat cgactacatc gccgagcgag tgtctcccac caagcgcatc cggggcggag
1841 tcgtcttcgt ggacgacatc cccaagggcg ccaccggcaa gctggtgaga agcgagctgc ggaagctgct ggcccagaag
1921 aagtccaagc tgtaatctag agcggccgcc cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg
2001 cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt
2081 taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct
2161 acaaatgtgg tatggagctc ccgcggcccg gggatcctc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg
2241 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg cggcattttg
2321 ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca
2401 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa
2481 gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa
2561 tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca
2641 taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac
2721 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac
2801 cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat
2881 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat
2961 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt
3041 tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc
3121 attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag
3201 gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga
3281 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag
3361 cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat
3441 actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat
3521 cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg
3601 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta
3681 cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac
3761 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg
3841 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg
3921 gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgg taccgatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt
4001 acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta
4081 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt
4161 tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatcataat cagccatacc acatttgtag aggttttact
4241 tgctttaaaa aacctcccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg
4321 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt
4401 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctg

(6) pSLG(PEST)-test、pSLO(PEST)-test

表1. pSLG(PEST)-test、pSLO(PEST)-testベクターを1または2箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位	
Acc 65I	1	3876		*Bsp* CI	1	2600		*Not* I	1	1859	
Acc I	2	7	263	*Bsp* DI	1	16		*Nsp* I	2	40	3860
Acl I	2	2369	2742	*Bsp* MI	2	1114	651	*Pae* R7I	1	1	
Afl III	2	28	3860	*Bsr* BRI	2	3882	4119	*Pci* I	1	3860	
Ahd I	1	2967		*Bsr* DI	2	2731	2913	*Psh* BI	1	2796	
Alw 44I	2	2300	3546	*Bsr* GI	1	368		*Psp* 1406I	2	2369	2742
Alw NI	2	565	3446	*Bss* SI	2	2303	3687	*Psp* AI	1	2104	
Apa I	1	170		*Bst* API	1	1810		*Psp* OMI	1	170	
Apa LI	2	2300	3546	*Bst* XI	1	83		*Pst* I	2	76	1808
Ase I	1	2796		*Bst* ZI	2	58	1860	*Pvu* I	1	2600	
Ava I	2	1	2104	*Bsu* 36I	1	192		*Pvu* II	1	258	
Avi II	1	2747		*Cfr* 9I	1	2104		*Sac* I	1	2092	
Axy I	1	192		*Cla* I	1	16		*Sac* II	1	2098	
Bal I	2	1016	1061	*Drd* I	1	3752		*Sal* I	1	7	
Bam HI	1	2110		*Eag* I	2	58	1860	*San* DI	1	128	
Ban III	1	16		*Eam* 1105I	1	2967		*Sca* I	1	2489	
Bbs I	2	1152	1630	*Ecl* HKI	1	2967		*Sex* AI	1	1421	
Bbu I	1	40		*Eco* 52I	2	58	1860	*Sgr* AI	2	1020	1509
Bcg I	1	2445		*Eco* 81I	1	192		*Sma* I	1	2104	
Bgl I	1	2848		*Eco* ICRI	1	2092		*Spe* I	1	52	
Bgl II	1	46		*Eco* RI	1	70		*Sph* I	1	40	
Blp I	1	1716		*Eco* RV	1	64		*Ssp* I	1	2165	
Bmr I	2	2922	563	*Fsp* I	1	2747		*Tfi* I	2	881	923
Bpu 1102I	1	1716		*Hin*d III	2	22	1714	*Vsp* I	1	2796	
Bsa AI	1	1183		*Kpn* I	1	3876		*Xba* I	1	1853	
Bsa BI	2	3882	4119	*Mlu* I	1	28		*Xho* I	1	1	
Bso BI	2	1	2104	*Msc* I	2	1016	1061	*Xma* I	1	2104	
Bsp 106I	1	16		*Nco* I	2	89	1722				
Bsp 1407I	1	368		*Nhe* I	1	34					

表 2. pSLG(PEST)-test、pSLO(PEST)-test ベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Acc* B7I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Asc* I	*Avr* II
Bae I	*Bbr* PI	*Bbv* CI	*Bfr* I	*Bln* I	*Bsi* WI	*Bsm* BI	*Bsp* EI	*Bss* HII	*Bst* 1107I
Bst 98I	*Bst* BI	*Bst* EII	*Bst* PI	*Bst* Z17I	*Cbi* I	*Cpo* I	*Csp* 45I	*Csp* I	*Dra* III
Eco 105I	*Eco* 47III	*Eco* 72I	*Eco* O65I	*Eco* T22I	*Fse* I	*IPpo* I	*Lsp* I	*Mro* I	*Nde* I
Nru I	*Nsi* I	*Nsp* V	*Pac* I	*Pfl* FI	*Pfl* MI	*Pma* CI	*Pme* I	*Pml* I	*Psh* AI
Rsr II	*Sap* I	*Sbf* I	*Sfi* I	*Sgf* I	*Sna* BI	*Srf* I	*Sse* 8387I	*Stu* I	*Swa* I
Tth 111I	*Van* 91I								

pSLG(PEST)-test ベクター配列

```
  1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
 81 gcccaccacc atggctaacg agatcatcct gcacggcgcc aagcccaggg accccctgga cctgggcacc gccggcattc
161 agctctacag ggccctgacc aacttctcct tcctgaggga ggccctgatc gacgcccaca ccgaggaggt ggtgtcttac
241 gccgacatcc tggagaacag ctgtagactg gctaagtgct acgagaacta cggcctgcgc cagaacagcg tgatctccgt
321 gtgcagcgag aatagcacca tcttcttcta ccccgtgatc gccgccctgt acatgggcgt gatcaccgcc accgtgaacg
401 acagctacac cgagcgggag ctgctggaga ccctgaacat ctccaagccc gaactggtgt tctgctccaa gaaggccatc
481 aagaacatga tggccctgaa gaggaacgtg aacttcatca agaaggtggt gctgctggac agcaaggagg atatgggcga
561 ggcccagtgc ctgagcaact tcatggcccg gtactccgag cccaacctgg acgtgagaaa cttcaagcca agggacttcg
```

```
 641 acgccaagga gcaggtggcc cttattatgt cctcctctgg caccaccggc ctgccaaagg gcgtggtgct gacccacagg
 721 aacctgagcg tgcgcttcgt ccactgcaag gaccccctgt tcggcaccag aaccatcccc tccacctcca tcctgtccat
 801 cgtgcccttc caccacgcct tcggaatgtt cacaaccctg tcctacttca tcgtgggcct gagagtggtg ctgctgaaga
 881 gattcgagga gaagttcttc ctgagcacca tcgagaagta cagaatccca acaatcgtgc tggcccctcc tgtgatggtg
 961 ttcctggcta agagccccct ggtggaccag tacgacctgt ccagcatcag agaggtggcc accggcggcg cccctgtggg
1041 caccgaggtt gccgtggccg tggccaagcg gctgaagatc ggcggcatcc tccagggcta cggcctgacc gagacctgct
1121 gcgccgtgct gatcaccccc cacgacgacg tgaagaccgg ctccaccggc agggtagccc cctacgtgca ggctaagatc
1201 gtggacctga ccaccggcaa gtccctggga cctaacaaga gaggcgagct gtgcttcaag agcgagatca tcatgaaggg
1281 ctacttcaac aacaagcagg ccaccgagga ggccatcgac aaggagggct ggctgcactc cggcgacgtg ggatactacg
1361 acgacgatgg acatttcttc gtggtggacc ggctgaaaga gctgatcaag tacaagggct accaggtggc ccccgccgag
1441 ctggagtggc tgctgctcca gcacccatcc atcaaggatg ccggcgtgac cggcgtgccc gacgaggccg ccggcgagct
1521 gcccggcgcc tgcatcgtgc tccaggaggg caagagcctg accgagcagg agatcatcga ctacatcgcc gagcgagtgt
1601 ctcccaccaa gcgcatccgg ggcggagtcg tcttcgtgga cgacatcccc aagggcgcca ccggcaagct ggtgagaagc
1681 gagctgcgga agctgctggc ccagaagaag tccaagctta gccatggctt cccgccggag gtggaggagc aggctgctgg
1761 cacgctgccc atgtcttgtg cccaggagag cgggatggac cgtcaccctg cagcctgtgc ttctgctagg atcaatgtgt
1841 agatgccatt cttctagagc ggccgcccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag
1921 tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa
2001 caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca
2081 aatgtggtat ggagctcccg cggcccgggg gatcctcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt
2161 caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct
2241 tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg
2321 aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt
2401 ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga
2481 cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa
2561 ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac
2641 atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac
2721 gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa
2801 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa
2881 tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat
2961 ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt
3041 ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg
3121 aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa
3201 gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg
3281 tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact
3361 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct
3441 gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc
3521 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag
3601 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg
3681 agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc
3761 gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc
3841 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcggtac cgatcataat cagccatacc acatttgtag aggttttact
3921 tgctttaaaa aacctcccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg
4001 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt
4081 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc
4161 tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag
4241 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
4321 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctg
```

pSLO(PEST)-test ベクター配列

```
  1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
 81 gcccaccacc atggctaacg agatcatcct gcacggcgcc aagcccaggg acccccctgga cctgggcacc gccggcattc
161 agctctacag ggccctgacc aacttctcct tcctgaggga ggccctgatc gacgcccaca ccgaggaggt ggtgtcttac
241 gccgacatcc tggagaacag ctgtagactg gctaagtgct acgagaacta cggcctgcgc cagaacagcg tgatctccgt
321 gtgcagcgag aatagcacca tcttcttcta ccccgtgatc gccgccctgt acatgggcgt gatcaccgcc accgtgaacg
401 acagctacac cgagcgggag ctgctggaga ccctgaacat ctccaagccc gaactggtgt tctgctccaa gaaggccatc
```

481 aagaacatga tggccctgaa gaggaacgtg aacttcatca agaaggtggt gctgctggac agcaaggagg atatgggcga
561 ggcccagtgc ctgagcaact tcatggcccg gtactccgag cccaacctgg acgtgagaaa cttcaagcca agggacttcg
641 acgccaagga gcaggtggcc cttattatgt cctcctctgg caccaccggc ctgccaaagg gcgtggtgct gacccacagg
721 aacctgagcg tgcgcttcgt ccactgcaag gaccccctgt tcggcaacag aaccatcccc tccacctcca tcctgtccat
801 cgtgcccttc caccacgcct tcggaatgtt cacaaccctg tcctacttca tcgtgggcct gagagtggtg ctgctgaaga
881 gattcgagga gaagttcttc ctgagcacca tcgagaagta cagaatccca acaatcgtgc tggcccctcc tgtgatggtg
961 ttcctggcta agagccccct ggtggaccag tacgacctgt ccagcatcag agaggtggcc accggcggcg cccctgtggg
1041 caccgaggtt gccgtggccg tggccaagcg gctgaagatc ggcggcatcc tccagggcta cggcctgacc gagacctgct
1121 gcgccgtgct gatcaccccc cacgacgacg tgaagaccgg ctccaccggc agggtagccc cctacgtgca ggctaagatc
1201 gtggacctga ccaccggcaa gtccctggga cctaacaaga gaggcgagct gtgcttcaag agcgagatca tcatgaaggg
1281 ctacttcaac aacaagcagg ccaccgagga ggccatcgac aaggagggct ggctgcactc cggcgacgtg ggatactacg
1361 acgacgatgg acatttcttc gtggtggacc ggctgaaaga gctgatcaag tacaagggct accaggtggc ccccgccgag
1441 ctggagtggc tgctgctcca gcacccatcc atcaaggatg ccggcgtgac cggcgtgccc gacgaggccg ccggcgagct
1521 gcccggcgcc tgcatcgtgc tccaggaggg caagagcctg accgagcagg agatcatcga ctacatcgcc gagcgagtgt
1601 ctcccaccaa gcgcatccgg ggcggagtcg tcttcgtgga cgacatcccc aagggcgcca ccggcaagct ggtgagaagc
1681 gagctgcgga agctgctggc ccagaagaag tccaagctta gccatggctt cccgccggag gtggaggagc aggctgctgg
1761 cacgctgccc atgtcttgtg cccaggagag cgggatggac cgtcaccctg cagcctgtgc ttctgctagg atcaatgtgt
1841 agatgccatt cttctagagc ggccgcccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag
1921 tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa
2001 caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca
2081 aatgtggtat ggagctcccg cggcccgggg gatcctcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt
2161 caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct
2241 tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg
2321 aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt
2401 ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga
2481 cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa
2561 ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac
2641 atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac
2721 gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa
2801 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa
2881 tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat
2961 ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt
3041 ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg
3121 aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa
3201 gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg
3281 tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact
3361 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct
3441 gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc
3521 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag
3601 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg
3681 agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc
3761 gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc
3841 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcggtac cgatcataat cagccatacc acatttgtag aggttttact
3921 tgctttaaaa aacctcccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg
4001 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt
4081 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc
4161 tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag
4241 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
4321 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctg

(7) pSLR(PEST)-test

表1. pSLR(PEST)-testを1または2箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位	
Acc 65I	1	3885	
Acc I	1	7	
Acl I	2	2378	2751
Afl III	2	28	3869
Ahd I	2	1070	2976
Alw 44I	2	2309	3555
Apa LI	2	2309	3555
Ase I	1	2805	
Avi II	1	2756	
Axy I	1	694	
Bam HI	1	2119	
Ban III	1	16	
Bbe I	1	1162	
Bbs I	1	903	
Bbu I	1	40	
Bbv CI	1	1686	
Bci VI	2	2133	3660
Bcl I	2	662	707
Bgl I	2	1658	2857
Bgl II	1	46	
Blp I	1	1725	
Bmr I	1	2931	
*Bpu*1102I	1	1725	
Bse RI	2	1753	944
*Bsp*106I	1	16	
*Bsp*1407I	1	404	
Bsp CI	2	117	2609
Bsp DI	1	16	
Bsp MI	1	1616	
Bsr DI	2	2740	2922
Bsr GI	1	404	
Bss SI	2	2312	3696
Bst API	1	1819	

酵素	箇所	切断部位	
Bst BI	1	250	
Bst EII	1	1599	
Bst PI	1	1599	
Bst XI	1	83	
Bst ZI	2	58	1869
Bsu 36I	1	694	
Cbi I	1	250	
Cfr 9I	1	2113	
Cla I	1	16	
Csp 45I	1	250	
Drd I	1	3761	
Eag I	2	58	1869
*Eam*1104I	2	97	2187
*Eam*1105I	2	1070	2976
Ear I	2	97	2187
Ecl HKI	2	1070	2976
Eco 52I	2	58	1869
Eco 81I	1	694	
*Eco*ICRI	1	2101	
*Eco*O65I	1	1599	
Eco RI	1	70	
Eco RV	1	64	
*Eco*T14I	2	89	1731
Ehe I	1	1162	
Fba I	2	662	707
Fsp I	1	2756	
Hind III	2	22	1723
Kas I	1	1162	
Kpn I	1	3885	
Lsp I	1	250	
Mlu I	1	28	
Mly I	2	3499	2982
Nar I	1	1162	

酵素	箇所	切断部位	
Nco I	2	89	1731
Nhe I	1	34	
Not I	1	1868	
Nsp V	1	250	
Pae R7I	1	1	
Pci I	1	3869	
Ple I	2	2982	3499
Psh BI	1	2805	
*Psp*1406I	2	2378	2751
Psp AI	1	2113	
Pvu I	2	117	2609
Pvu II	2	160	1519
Sac I	1	2101	
Sac II	1	2107	
Sal I	1	7	
Sbf I	1	1089	
Sca I	1	2498	
Sex AI	1	1424	
Sfo I	1	1162	
Sgf I	1	116	
Sgr AI	1	1341	
Sma I	1	2113	
Spe I	1	52	
Sph I	1	40	
*Sse*8387I	1	1089	
Ssp I	1	2174	
Sty I	2	89	1731
Vsp I	1	2805	
Xba I	1	1862	
Xcm I	2	968	1307
Xho I	1	1	
Xma I	1	2113	
Xmn I	1	2377	

表 2. pSLR(PEST)-test ベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Acc* B7I	*Acc* III	*Afe* I	*Afl* II	*Age* I	*Aor* 51HI	*Apa* I	*Asc* I
Avr II	*Bae* I	*Bbr* PI	*Bfr* I	*Bln* I	*Bsa* AI	*Bsi* WI	*Bsm* BI	*Bsp* EI	*Bss* HII
*Bst*1107I	*Bst* 98I	*Bst* Z17I	*Btr* I	*Cpo* I	*Csp* I	*Dra* III	*Eco* 105I	*Eco*47III	*Eco* 72I
*Eco*O109I	*Eco* T22I	*Fse* I	*IPpo* I	*Mro* I	*Nde* I	*Nru* I	*Nsi* I	*Pac* I	*Pfl* FI
Pfl MI	*Pma* CI	*Pme* I	*Pml* I	*Ppu* MI	*Psh* AI	*Psp*OMI	*Rsr* II	*San* DI	*Sap* I
Sfi I	*Sna* BI	*Srf* I	*Stu* I	*Swa* I	*Tth* 111I	*Van* 91I			

pSLR(PEST)-test ベクター配列

```
  1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
 81 gcccaccacc atggaagaag agaacatcgt gaatggcgat cgccctcggg atctggtgtt ccctggcaca gccggcctgc
161 agctgtatca gtccctgtat aaatactctt acatcaccga cggaatcatc gacgcccaca ccaacgaggt gatctcctat
241 gcccagattt tcgaaacaag ttgccgcctg gccgtgagcc tggagaagta tggcctggat cacaacaacg tggtggccat
321 ttgcagcgag aacaacatcc acttcttcgg ccctctgatc gctgccctat accaggggat tccaatggcc acatccaacg
```

401 atatgtacac cgagagggag atgatcggcc acctgaacat ctccaagcca tgtctgatgt tctgttccaa gaagtccctg
481 ccattcatcc tgaaggtgca gaagcacctg gactttctca agaaggtgat cgtgatcgac agcatgtacg acatcaacgg
561 cgtggagtgc gtgttcagtt tcgtgtcccg gtacaccgat catgcgttcg atccagtgaa gttcaaccct aaagagtttg
641 atcccctgga gagaaccgcg ctgatcatga catcctctgg aacaaccggc ctgcctaagg gcgtggtgat cagccacagg
721 agcatcacca tcagattcgt ccacagcagc gatcccatct acggcacccg catcgcccca gatacatcca tcctggccat
801 cgcccctttc caccacgcct tcggactgtt taccgccctg gcttactttc cagtgggcct gaagatcgtg atggtgaaaa
881 agtttgaggg cgagttcttc ctgaagacca tccagaacta caagatcgct tctatcgtgg tgcctcctcc aatcatggtg
961 tatctggcca agagccctct ggtggatgag tacaatctgt ccagcctgac agagatcgcc tgtggcggct cccctctggg
1041 cagagacatc gccgacaagg tggccaagag actgaaggtc cacggcatcc tgcagggcta tggcctgacc gagacctgta
1121 gcgccctgat cctgagcccc aacgatagag agctgaagaa gggcgccatc ggcaccccta tgccctatgt ccaggtgaag
1201 gtgattgaca tcaacaccgg caaagccctg ggaccaagag agaagggcga gatttgcttc aagagccaga tgctgatgaa
1281 gggctaccac aacaacccac aggccaccag ggatgccctg gacaaggacg ggtggctgca caccggcgat ctgggctact
1361 acgacgagga cagattcatc tatgtggtgg atcggctgaa agaactcatc aagtacaagg gctaccaggt ggcccctgcc
1441 gagctggaga acttgcttct gcagcaccct aacatctctg atgccggcgt catcggcatc ccagacgagt ttgccggcca
1521 gctgccttcc gcctgtgtcg tgctggagcc tggcaagacc atgaccgaga aggaggtgca ggattatatc gccgagctgg
1601 tgaccaccac caagcacctg cggggcggcg tggtgttcat cgacagcatt ccgaaaggcc caacaggcaa gctgatgaga
1681 aacgagctga gggccatctt tgcccgcgag caggccaagt ccaagcttag ccatggcttc ccgccggagg tggaggagca
1761 ggctgctggc acgctgccca tgtcttgtgc ccaggagagc gggatggacc gtcaccctgc agcctgtgct tctgctagga
1841 tcaatgtgta gatgccattc ttctagagcg gccgcccaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact
1921 agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa
2001 acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa
2081 acctctacaa atgtggtatg gagctcccgc ggcccggggg atcctcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga
2161 taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc
2241 attttgcctt cctgtttttg ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg
2321 gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact
2401 tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc
2481 tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg
2561 ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt
2641 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg
2721 tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc
2801 aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt
2881 gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat
2961 cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga
3041 ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg
3121 atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc
3201 cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc
3281 taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata
3361 ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct
3441 gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg
3521 ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga
3601 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt
3681 cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct
3761 gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg
3841 ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcggtacc gatcataatc agccatacca catttgtaga
3921 ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact
4001 tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat
4081 tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctggat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt
4161 tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct ccccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt
4241 ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct
4321 agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctg

[7] トラブルシューティング

(1) クローニング

現象	対応
ターゲット領域の PCR 増幅が上手くいかない	ターゲット領域に GC リッチな領域が含まれる場合、PCR 反応効率が低下することがあります。下記のように PCR を行うことによって改善される場合があります。 ・PCR を 2 ステップサイクルにする。 ・PCR の Denature ステップを 98℃、10 秒にする。 ・5%程度の DMSO を PCR 反応液に添加する。
コロニーダイレクト PCR が上手くいかない	適切なプライマーを使用してください（p.7 参照）。 また、上記のように PCR を行うことによって改善される場合があります。

(2) トランスフェクション

現象	対応
ルシフェラーゼが発現しない、または発現が低い	・ もともと発現の低いプロモーターの可能性があります。低レベルの発現の確認にはSLOまたはSLGが適しています。SLR に連結されている場合、SLO あるいは SLG に組み換えることをお薦めします。 ・ トランスフェクション試薬あるいは条件が不適当な可能性があります。試薬や条件を変えて実施してください。 ・ プラスミド抽出の際、大腸菌が混入した可能性があります（顕微鏡で観察すると、細胞以外に菌体が認められます）。フェノール／クロロホルム抽出を実施してください。 ・ プラスミドの純度が低い可能性があります。Endotoxin の混入が少なくなるように再精製してください。

[8] 参考文献

1. Nakajima, Y., Kimura, T., Suzuki, C., and Ohmiya, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 948-951(2004)
2. Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y. and Honma, K. *FEBS Letters* **565**, 122-126 (2004)
3. 近江谷克裕 生化学, **76**, 5-15(2004)
4. 中島芳浩、菅田和法、近江谷克裕 バイオテクノロジージャーナル, 7-8, 453-455(2005)
5. Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, A., Kubota, H., Ikeda, M. and Ohmiya, Y. *Biotechniques*, **38**,891-894(2005)
6. Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., Kain, S.R. *J. Biol. Chem.* **273**, 34970-34975(1998)
7. Andrew G.B., Joanna B., Cameron S.O., and Peter N.C. *Plasmid,* **44**, 173-182(2000)

[9] 関連商品

品名	内容	Code No.
挿入配列確認用プライマー（フォワード、pSLG/pSLO/pSLR 共通） **SLGOR-F primer**	200 pmoles	MRV-401
挿入配列確認用プライマー（リバース、pSLG/pSLO 共通） **SLGO-R primer**	200 pmoles	MRV-402
挿入配列確認用プライマー（リバース、pSLR 用） **SLR-R primer**	200 pmoles	MRV-403
MultiReporter Assay System –Tripluc®– *in vitro* アッセイ用試薬 **Detection Reagents**	100 回用	MRA-101
MultiReporter Assay System –Tripluc®– *in vivo* アッセイ用試薬 **D-luciferin（カリウム塩）**	20 mg 20 mg x 5	MRL-101 MRL-101X5
High Fidelity PCR 用酵素 **KOD –Plus–**	200 U	KOD-201
High Fidelity PCR 用酵素 **KOD –Plus– Ver.2**	200 U	KOD-211
Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素 **Blend Taq®**	250 U	BTQ-101
Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素（Hot start 対応） **Blend Taq® –Plus–**	250 U	BTQ-201
簡単ライゲーション **Ligation high**	50 回用	LGK-101
コンピテントセル **Competent high DH5α**	0.1ml×10 本	DNA-903
PCR スクリーニング **InsertCheck –Ready–/InsertCheck –Ready– *Blue*** <プライマーフリー＞	100 回用	PIK-151 PIK-251

【製造・販売元】

TOYOBO 東洋紡績株式会社

－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部 （大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部（東京）
〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号 東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819 FAX 03-6422-4951
E-mail: order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 （土、日、祝を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio